

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/38, 15/44, 15/40, 15/35, 15/31, A61K 39/295</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/03658</b>
			(43) Date de publication internationale: 29 janvier 1998 (29.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01313 (22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/09338          19 juillet 1996 (19.07.96)          FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDONNET, Jean-Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). BOUCHARDON, Annabelle [FR/FR]; 118, cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). BAUDU, Philippe [FR/FR]; 58, avenue Edouard Simon, F-69290 Craponne (FR). RIVIERE, Michel [FR/FR]; 11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR). (74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE VACCINE FORMULA FOR TREATING PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE DISEASES

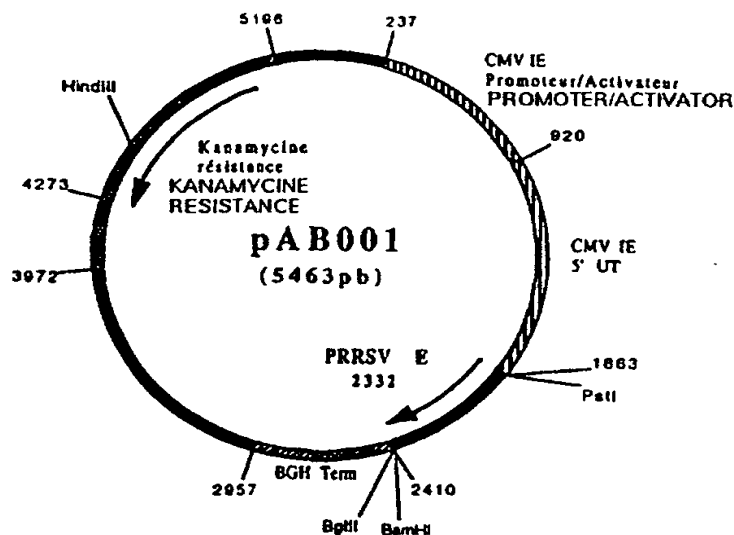
(54) Titre: FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES ET DE REPRODUCTION DES PORCS

## (57) Abstract

A porcine vaccine formula for treating porcine respiratory and reproductive disease, including at least three polynucleotide vaccine valencies that each include a plasmid containing a porcine pathogen valency gene capable of being expressed *in vivo* in host cells. Said valencies are selected from two groups which consist of Aujeszky's disease virus, swine influenza virus, mysterious swine disease virus, parvovirus disease virus, pest disease virus, and bacteria causing actinobacillosis. Said plasmids include one or more genes per valency, and said genes are selected from the group which consists of gB and gD for Aujeszky's disease virus, HA, NP and N for swine influenza virus, E, N, ORF3 and M for mysterious swine disease virus, VP2 for parvovirus disease virus, E1 and E2 for pest disease virus, and apxI, apxII and apxIII for actinobacillosis virus.

## (57) Abrégé

La formule de vaccin porcin contre la pathologie respiratoire et/ou de reproduction des porcs, comprend au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à exprimer *in vivo* dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène porcin, ces valences étant choisies parmi deux groupes consistant en virus de la maladie d'Aujeszky, virus de la grippe porcine, mystérieuse du porc, virus de la grippe porcine, virus de la maladie mystérieuse du porc, virus de la parvovirose, virus de la pestivirose et bactéries responsables de l'actinobacillose, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la maladie d'Aujeszky, HA, NP, N pour le virus de la grippe porcine, E, N, ORF3, M pour le virus de la maladie mystérieuse, VP2 pour le virus de la parvovirose, E1, E2 pour le virus de la pestivirose et apxI, apxII et apxIII pour le virus de l'actinobacillose.



# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES  
RESPIRATOIRES ET DE REPRODUCTION DES PORCS

La présente invention est relative à une formule de vaccin  
5 permettant notamment la vaccination des porcs contre les  
pathologies respiratoires et de reproduction. Elle est  
également relative à une méthode de vaccination correspondante.

Au cours des dernières décennies, les méthodes de  
production porcines ont fondamentalement changé. L'élevage  
10 intensif en espace clos s'est généralisé avec comme corollaire  
le développement dramatique des pathologies respiratoires.

L'ensemble des symptômes de pathologie respiratoire  
porcine est en général regroupé sous l'appellation complexe de  
maladie respiratoire des porcs et implique une grande variété  
15 d'agents pathogènes, comprenant aussi bien des virus que des  
bactéries et des mycoplasmes.

Les principaux agents intervenant dans les troubles  
respiratoires sont *Actinobacillus pleuropneumoniae*, le virus de  
l'infertilité et du syndrome respiratoire (PRRS) encore appelé  
20 virus de la maladie mystérieuse, le virus de la maladie  
d'Aujeszky (PRV) et le virus de la grippe porcine.

D'autres virus entraînent des troubles de la reproduction  
se traduisant par des avortements, des momifications de fœtus  
et de l'infertilité. Les principaux virus sont PRRS, le  
25 parvovirus et le virus de la peste porcine classique (HCV).  
Secondairement, les virus PRV grippe porcine et *A.*  
*pleuropneumoniae* peuvent aussi entraîner de tels troubles. Des  
mortalités peuvent intervenir avec *A. pleuropneumoniae*, HCV et  
PRV.

30 En outre, les interactions entre les microorganismes sont  
très importants dans le complexe respiratoire porcin. En effet,  
la plupart des pathogènes bactériens sont des hôtes habituels  
des zones nasopharyngées et des amygdales chez le jeune animal.  
Ces pathogènes, qui proviennent de la truie, sont souvent  
35 inhalés par les jeunes porcs durant leurs premières heures de  
vie, avant que l'immunité colostrale soit devenue efficace. Les  
organismes résidant dans le tractus respiratoire supérieur  
peuvent envahir le tractus inférieur lorsque les mécanismes de

défense respiratoires de l'hôte sont mis à mal par un agent précurseur tel que *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou par des virus. L'invasion pulmonaire peut être très rapide en particulier dans le cas de pathogènes précurseurs tels que *Actinobacillus pleuropneumoniae* qui produisent des cytotoxines puissantes capables d'endommager les cils des cellules épithéliales respiratoires et les macrophages alvéolaires.

Des infections virales importantes, telles que influenza, infections à coronavirus respiratoires et virus d'Aujeszky, peuvent jouer un rôle dans la pathogénie du complexe respiratoire, au côté de bactéries à tropisme respiratoire et de mycoplasmes.

Enfin certains agents ont une incidence à la fois en respiratoire et en reproduction. Des interactions peuvent aussi se produire sur le plan de la pathologie de la reproduction.

Il paraît donc nécessaire de tenter de mettre au point une prévention efficace contre les principaux agents pathogènes intervenant dans les pathologies respiratoires et de reproduction des porcs.

Les associations développées jusqu'à présent étaient réalisées à partir de vaccins inactivés ou de vaccins vivants et éventuellement de mélanges de tels vaccins. Leur mise en oeuvre pose des problèmes de compatibilité entre valences et de stabilité. Il faut en effet assurer à la fois la compatibilité entre les différentes valences de vaccin, que ce soit au plan des différents antigènes utilisés au plan des formulations elles-mêmes, notamment dans le cas où l'on combine à la fois des vaccins inactivés et des vaccins vivants. Il se pose également le problème de la conservation de tels vaccins combiné et aussi de leur innocuité notamment en présence d'adjuvant. Ces vaccins sont en général assez coûteux.

Les demandes de brevet WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660 ont fait usage de la technique récemment développée des vaccins polynucléotidiques. On sait que ces vaccins utilisent un plasmide apte à exprimer dans les cellules de l'hôte l'antigène inséré dans le plasmide. Toutes les voies d'administration ont été proposées (intrapéritonéal, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée, intradermique,

mucosale, etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant de transférer à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux et les tissus mammaires (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés par exemple au sein de liposomes de lipides cationiques.

M-F Le Potier et al., (Second International Symposium on the Eradication of Aujeszky's Disease (pseudo rabies) Virus August 6th to 8th 1995 Copenhagen, Denmark) et M. Monteil et al. (Les Journées d'Animation Scientifique du Département de Pathologie Animale, INRA-ENV, Ecole Nationale Vétérinaire de LYON, 13-14 déc 1994) ont tenté de vacciner les porcs contre le virus de la maladie d'Aujeszky à l'aide d'un plasmide permettant l'expression du gène gD sous le contrôle d'un promoteur fort, le promoteur majeur tardif de l'adénovirus de type 2. Malgré une réponse en anticorps de bon niveau, aucune protection n'a pu être mise en évidence. Or, des résultats satisfaisants en matière de protection ont été enregistrés après inoculation aux porcs d'un adénovirus recombinant dans lequel a été inséré le gène gD et le même promoteur, prouvant que la glycoprotéine gD serait suffisante pour induire une protection chez le porc.

L'art antérieur ne donne aucun résultat de protection chez le porc par la méthode de la vaccination polynucléotidique.

L'invention se propose de fournir une formule de vaccin multivalent permettant d'assurer une vaccination des porcs contre un certain nombre d'agents pathogènes intervenant notamment dans la pathologie respiratoire et/ou dans la pathologie de la reproduction.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin associant différentes valences tout en présentant tous les critères requis de compatibilité et de stabilité des valences entre elles.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin permettant d'associer différentes valences dans un même véhicule.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin qui soit de mise en oeuvre aisée et peu coûteuse.

Un autre objectif encore de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin et une méthode de vaccination des porcs qui permette d'obtenir une protection, y compris une protection multivalente, avec un niveau élevé d'efficacité et de longue durée, ainsi qu'une bonne innocuité et une absence de résidus.

La présente invention a donc pour objet une formule de vaccin notamment contre la pathologie respiratoire et/ou de reproduction des porcs, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène porcin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la maladie d'Aujeszky (virus PRV ou pseudorage), virus de la grippe porcine (virus influenza porcin, SIV), virus de la maladie mystérieuse du porc (virus PRRS), virus de la parvovirose (virus PPV), virus de la peste porcine classique (virus HCV ou Hog Cholera virus) et bactérie responsable de l'actinobacillose (*A. pleuropneumoniae*), les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la maladie d'Aujeszky, HA, NP, N pour le virus de la grippe porcine, ORF5 (E), ORF3, ORF6 (M) pour le virus PRRS, VP2 pour le virus de la parvovirose, E1, E2 pour le virus de la peste porcine classique et apxI, apxII et apxIII pour *A. pleuropneumoniae*.

Par valence, dans la présente invention, on entend au moins un antigène assurant une protection contre le virus du pathogène considéré, la valence pouvant contenir, à titre de sous-valence, un ou plusieurs gènes naturels modifiés d'une ou plusieurs souches du pathogène considéré.

Par gène d'agent pathogène, on entend non seulement le gène complet, mais aussi les séquences nucléotidiques

différentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion de gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différentes mais codant pour la même protéine. Elle recouvre aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été modifiées pour faciliter l'expression in vivo par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

De manière préférée, la formule de vaccin selon l'invention comprendra les valences Aujeszky et grippe porcine auxquelles on pourra adjoindre d'autres valences, de préférence choisies parmi les valences PRRS et A. pleuropneumoniae (actinobacillose). On pourra leur adjoindre éventuellement d'autres valences choisies parmi les valences parvovirose et peste porcine classique.

Il va de soi que toutes les combinaisons de valences sont possibles. Toutefois, dans le cadre de l'invention, on considère les valences Aujeszky et grippe porcine, puis PRRS et A. pleuropneumoniae comme préférées.

Dans l'optique d'une vaccination dirigée plus spécifiquement contre la pathologie respiratoire des porcs, on préférera sélectionner les valences parmi Aujeszky, grippe porcine, PRRS et actinobacillose.

Dans l'optique d'une vaccination dirigée spécifiquement contre la pathologie de la reproduction, on préférera choisir les valences parmi PRRS, parvovirose, peste porcine classique et Aujeszky.

En ce qui concerne, la valence Aujeszky, on peut mettre en oeuvre l'un ou l'autre des gènes gB et gD. Préférentiellement, on utilise les deux gènes, ceux-ci étant dans ce cas montés dans des plasmides différents ou dans un seul et même plasmide.

En ce qui concerne la valence grippe porcine, on préfère mettre en oeuvre les gènes HA et NP. On peut utiliser l'un ou l'autre de ces deux gènes ou les deux gènes simultanément, montés dans des plasmides différents ou dans un seul et même

plasmide. De préférence, on associera dans le même vaccin les séquences HA de plus d'une souche de virus influenza, en particulier des différentes souches rencontrées sur le terrain. En revanche, NP assure une protection croisée et l'on pourra donc se contenter de la séquence d'une seule souche du virus.

En ce qui concerne la valence PRRS, on préfère utiliser les gènes E et ORF3 ou encore M. On peut utiliser ces gènes seuls ou en combinaison ; dans le cas d'une combinaison, on peut monter les gènes dans des plasmides séparés ou dans des plasmides combinant 2 ou 3 de ces gènes. On pourra avantageusement associer dans le même vaccin des gènes provenant d'au moins deux souches, notamment d'une souche européenne et d'une souche américaine.

En ce qui concerne la valence peste porcine classique, on peut utiliser l'un ou l'autre des gènes E1 et E2 ou également des gènes E1 et E2 combinés, dans deux plasmides différents ou éventuellement dans un seul et même plasmide.

En ce qui concerne la valence actinobacillose, on peut utiliser l'un des trois gènes cités plus haut ou une combinaison de 2 ou 3 de ces gènes, montés dans des plasmides différents ou des plasmides mixtes, afin d'assurer une protection contre les différents sérotypes de *A. pleuropneumoniae*. Pour les antigènes apxI, II et III, on peut prévoir de modifier les séquences codantes pour obtenir les antigènes détoxifiés, en particulier comme dans les exemples.

La formule de vaccin selon l'invention pourra se présenter sous un volume de dose compris de manière générale entre 0,1 et 10 ml, et en particulier entre 1 et 5 ml notamment pour les vaccinations par voie intramusculaire.

La dose sera généralement comprise entre 10 ng et 1 mg, de préférence entre 100 ng et 500 µg et préférentiellement entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

On utilisera de préférence des plasmides nus simplement placés dans le véhicule de vaccination qui sera en général de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %), de l'eau ultrapure, du tampon TE, etc. On peut bien entendu utiliser toutes les formes de vaccin polynucléotidiques décrites dans l'art antérieur.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer



l'expression du gène inséré sous sa dépendance dans les cellules hôtes. Il s'agira en général d'un promoteur eucaryote fort et en particulier d'un promoteur précoce du cytomégalo virus CMV-IE, d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cochon, cobaye.

De manière plus générale, le promoteur pourra être soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme promoteur viral, on peut citer le promoteur précoce ou tardif du virus SV40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Il peut aussi s'agir d'un promoteur du virus dont provient le gène, par exemple le promoteur propre au gène.

Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, par exemple le promoteur de la desmine (Bolmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 ; et ZHENLIN et al., Gene, 1989, 78, 243-254), ou encore le promoteur de l'actine.

Lorsque plusieurs gènes sont présents dans le même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans deux unités différentes.

La combinaison des différentes valences du vaccin selon l'invention peut être effectuée, de préférence, par le mélange de plasmides polynucléotidiques exprimant le ou les antigène(s) de chaque valence, mais on peut également prévoir de faire exprimer des antigènes de plusieurs valences par un même plasmide.

L'invention a encore pour objet des formules de vaccin monovalent comprenant un ou plusieurs plasmides codant pour un ou plusieurs gènes de l'un des virus choisis parmi le groupe consistant en PRV, PRRS, PPV, HCV et A. pleuropneumoniae, les gènes étant ceux décrits plus haut. En dehors de leur caractère monovalent, ces formules peuvent reprendre les caractéristiques énoncées plus haut en ce qui concerne le choix des gènes, leurs combinaisons, la composition des plasmides, les volumes de dose, les doses, etc.

Les formules de vaccin monovalent peuvent être utilisées (i) pour la préparation d'une formule de vaccin polyvalent tel que décrit plus haut, (ii) à titre individuel contre la

pathologie propre, (iii) associées à un vaccin d'un autre type (entier vivant ou inactivé, recombinant, sous-unité) contre une autre pathologie, ou (iv) comme rappel d'un vaccin comme décrit ci-après.

5 La présente invention a en effet encore pour objet l'utilisation d'un ou de plusieurs plasmides selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les porcs primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin classique du type de ceux de la technique antérieure, à savoir notamment choisi  
10 dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin (monovalent ou multivalent) présentant (c'est-à-dire contenant ou pouvant exprimer) le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmides ou antigène(s) assurant une  
15 protection croisée. De manière remarquable, le vaccin polynucléotidique a un effet de rappel puissant se traduisant par une amplification de la réponse immunitaire et l'installation d'une immunité de longue durée.

De manière générale, les vaccins de primo-vaccination  
20 pourront être choisis parmi les vaccins commerciaux disponibles auprès des différents producteurs de vaccins vétérinaires.

L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus et une formule de vaccin selon l'invention pour le  
25 rappel. Elle a aussi trait à une formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-avant.

La présente invention a également pour objet une méthode  
30 de vaccination des porcs contre la pathologie respiratoire et/ou la pathologie de la reproduction des porcs, comprenant l'administration d'une dose efficace d'une formule de vaccin telle que décrit plus haut. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de la  
35 formule de vaccin, ces doses pouvant être administrées successivement dans un court laps de temps et/ou successivement à des moments éloignés l'un de l'autre.

Les formules de vaccin selon l'invention pourront être

administrées dans le cadre de cette méthode de vaccination, par les différentes voies d'administration proposées dans l'art antérieur pour la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues. On pourra notamment  
5 utiliser la vaccination par voie intradermique à l'aide d'un injecteur par jet liquide, de préférence par jets multiples, et en particulier un injecteur utilisant une tête d'injection munie de plusieurs trous ou buses, notamment comprenant de 5 à 6 trous ou buses, tel que l'appareil Pigjet fabriqué et  
10 distribué par la société Endoscoptic, Laons, France.

Le volume de dose pour un tel appareil sera réduit de préférence entre 0,1 et 0,9 ml, en particulier entre 0,2 et 0,6 ml et avantageusement entre 0,4 et 0,5 ml, le volume pouvant être appliqué en une ou plusieurs, de préférence 2,  
15 applications.

L'invention a encore pour objet la méthode de vaccination consistant à faire une primo-vaccination telle que décrite ci-dessus et un rappel avec une formule de vaccin selon l'invention. Dans une forme de mise en oeuvre préférée du  
20 procédé selon l'invention, on administre dans un premier temps, à l'animal, une dose efficace du vaccin de type classique, notamment inactivé, vivant, atténué ou recombinant, ou encore un vaccin de sous-unité de façon à assurer une primo-vaccination, et, après un délai de préférence de 2 à 6  
25 semaines, on assure l'administration du vaccin polyvalent ou monovalent selon l'invention.

L'invention concerne aussi la méthode de préparation des formules de vaccin, à savoir la préparation des valences et leurs mélanges, telle qu'elle ressort de cette description.

30 L'invention va être maintenant décrite plus en détails à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris en référence aux dessins annexés.

## Liste des figures

- Figure N° 1 : Plasmide pVR1012
- Figure N° 2 : Séquence du gène PRV gB (souche NIA3)
- 5 Figure N° 3 : Construction du plasmide pAB090
- Figure N° 4 : Séquence du gène PRV gD (souche NIA3)
- Figure N° 5 : Construction du plasmide pPB098
- Figure N° 6 : Séquence du gène Grippe porcine HA (souche H1N1)
- Figure N° 7 : Construction du plasmide pPB143
- 10 Figure N° 8 : Séquence du gène Grippe porcine NP (souche H1N1)
- Figure N° 9 : Construction du plasmide pPB142
- Figure N° 10 : Séquence du gène Grippe porcine HA (souche H3N2)
- Figure N° 11 : Construction du plasmide pPB144
- Figure N° 12 : Séquence du gène Grippe porcine NP (souche H3N2)
- 15 Figure N° 13 : Construction du plasmide pPB132
- Figure N° 14 : Plasmide pAB025
- Figure N° 15 : Plasmide pAB001
- Figure N° 16 : Plasmide pAB091
- Figure N° 17 : Plasmide pAB092
- 20 Figure N° 18 : Plasmide pAB004
- Figure N° 19 : Plasmide pAB069
- Figure N° 20 : Plasmide pAB061
- Figure N° 21 : Plasmide pPB162
- Figure N° 22 : Plasmide pPB163
- 25 Figure N° 23 : Plasmide pPB174'
- Figure N° 24 : Plasmide pPB189
- Figure N° 25 : Plasmide pPB190

## Liste des séquences SEQ ID N°

	SEQ ID N° 1 :	Séquence du gène PRV gB (souche NIA3)
	SEQ ID N° 2 :	Oligonucléotide AB166
5	SEQ ID N° 3 :	Oligonucléotide AB167
	SEQ ID N° 4 :	Oligonucléotide AB168
	SEQ ID N° 5 :	Oligonucléotide AB169
	SEQ ID N° 6 :	Séquence du gène PRV gD (souche NIA3)
	SEQ ID N° 7 :	Oligonucléotide PB101
10	SEQ ID N° 8 :	Oligonucléotide PB102
	SEQ ID N° 9 :	Oligonucléotide PB107
	SEQ ID N° 10 :	Oligonucléotide PB108
	SEQ ID N° 11 :	Séquence du gène grippe porcine HA (souche H1N1)
	SEQ ID N° 12 :	Oligonucléotide PB097
15	SEQ ID N° 13 :	Oligonucléotide PB098
	SEQ ID N° 14 :	Séquence du gène grippe porcine NP (souche H1N1)
	SEQ ID N° 15 :	Oligonucléotide PB095
	SEQ ID N° 16 :	Oligonucléotide PB096
	SEQ ID N° 17 :	Séquence du gène grippe porcine HA (souche H3N2)
20	SEQ ID N° 18 :	Séquence du gène grippe porcine NP (souche H3N2)
	SEQ ID N° 19 :	Oligonucléotide AB055
	SEQ ID N° 20 :	Oligonucléotide AB056
	SEQ ID N° 21 :	Oligonucléotide AB001
	SEQ ID N° 22 :	Oligonucléotide AB002
25	SEQ ID N° 23 :	Oligonucléotide AB170
	SEQ ID N° 24 :	Oligonucléotide AB171
	SEQ ID N° 25 :	Oligonucléotide AB172
	SEQ ID N° 26 :	Oligonucléotide AB173
	SEQ ID N° 27 :	Oligonucléotide AB007
30	SEQ ID N° 28 :	Oligonucléotide AB010
	SEQ ID N° 29 :	Oligonucléotide AB126
	SEQ ID N° 30 :	Oligonucléotide AB127

- SEQ ID N° 31 : Oligonucléotide AB118  
SEQ ID N° 32 : Oligonucléotide AB119  
SEQ ID N° 33 : Oligonucléotide PB174  
SEQ ID N° 34 : Oligonucléotide PB189  
5 SEQ ID N° 35 : Oligonucléotide PB190  
SEQ ID N° 36 : Oligonucléotide PB175  
SEQ ID N° 37 : Oligonucléotide PB176  
SEQ ID N° 38 : Oligonucléotide PB191  
SEQ ID N° 39 : Oligonucléotide PB192  
10 SEQ ID N° 40 : Oligonucléotide PB177  
SEQ ID N° 41 : Oligonucléotide PB278  
SEQ ID N° 42 : Oligonucléotide PB279  
SEQ ID N° 43 : Oligonucléotide PB280  
SEQ ID N° 44 : Oligonucléotide PB307  
15 SEQ ID N° 45 : Oligonucléotide PB303  
SEQ ID N° 46 : Oligonucléotide PB306  
SEQ ID N° 47 : Oligonucléotide PB304  
SEQ ID N° 48 : Oligonucléotide PB305

## EXEMPLES

### Exemple 1 : Culture des virus

Les virus sont cultivés sur le système cellulaire approprié jusqu'à obtention d'un effet cytopathique. Les systèmes cellulaires à utiliser pour chaque virus sont bien connus de l'homme du métier. Brièvement, des cellules sensibles au virus utilisé, cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM) ou un autre milieu approprié, sont inoculées avec la souche virale étudiée en utilisant une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à 37°C pendant le temps nécessaire à l'apparition d'un effet cytopathique complet (en moyenne 36 heures).

### Exemple 2 : Culture des bactéries et extraction de l'ADN bactérien

Les souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* ont été cultivées comme décrit par A. Rycroft *et al.* (J. Gen. Microbiol. 1991. 137. 561-568). L'ADN de haut poids moléculaire (ADN chromosomique) a été préparé selon les techniques standards décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

### Exemple 3 : Extraction des ADNs génomiques viraux:

Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0). Cette suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors être digéré par des enzymes de restriction.

**Exemple 4 : Isolement des ARNs génomiques viraux**

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en  
5 utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987, 162, 156-159).

**Exemple 5 : Techniques de biologie moléculaire**

10 Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit  
15 "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

**Exemple 6 : Technique de RT-PCR**

Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés  
20 de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes devant être amplifiés (voir exemples spécifiques). La réaction de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold  
25 Spring Harbor, New York, 1989). Chaque réaction de RT-PCR a été faite avec un couple d'amplimers spécifiques et en prenant comme matrice l'ARN génomique viral extrait. L'ADN complémentaire amplifié a été extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) avant d'être digéré par les enzymes de restriction.

30

**Exempl 7 : plasmide pVR1012**

Le plasmide pVR1012 (Figure N° 1) a été obtenu auprès de Vical Inc. San



Diego, CA, USA. Sa construction a été décrite dans J. Hartikka *et al.* (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

**Exemple 8 : Construction du plasmide pAB090 (gène PRV gB)**

- 5 Le plasmide pPR2.15 (M. Rivière *et al.* J. Virol. 1992. 66. 3424-3434) a été digéré avec *Apal* et *NaeI* pour libérer un fragment *Apal-NaeI* de 2665 pb (fragment A) contenant le gène codant pour la glycoprotéine gB du virus de la maladie d'Aujeszky (Souche NIA3) (Figure N° 2 et SEQ ID N° 1).

Par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

- 10 AB166 (33 mer) (SEQ ID N° 2)

5'GATGCCCCGCTGGTGGCGGTCTTTGGCGCGGGCC 3'

AB167 (33 mer) (SEQ ID N° 3)

5'ACGTCTACGGGCGACCAACCGCCAGAAACCGCGC 3'

un fragment de 33 pb contenant la séquence du gène gD, du codon initial ATG jusqu'au site *Apal* a été reconstitué, avec création d'un site *PstI* en 5' (fragment B).

- 15

Par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

AB168 (45 mer) (SEQ ID N° 4)

5'GGCACTACCAGCGCCTCGAGAGCGAGGACCCCGACGCCCTGTAGG 3'

- 20 AB169 (49 mer) (SEQ ID N° 5)

5'GATCCCTACAGGGCGTCGGGGTCCTCGCTCTCGAGGCGCTGGTAGTGCC 3'

un fragment de 45 pb contenant la séquence du gène gD, du site *NaeI* au codon stop TAG a été reconstitué, avec création d'un site *BamHI* en 3' (fragment C).

- 25 Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB090 (7603 pb) (Figure N° 3).

**Exemple 9 : Construction du plasmide pPB098 (gène PRV gD)**

- 30 Le plasmide pPR29 (M. Rivière *et al.* J. Virol. 1992. 66. 3424-3434) a été digéré par *SaI* et *BglII* pour libérer un fragment *SaI-BglII* de 711 pb (fragment A) contenant la partie 3' du gène codant pour la glycoprotéine gD du virus de

la maladie d'Aujeszky (Souche NIA3) (Figure N° 4 et SEQ ID N° 6).

Le plasmide pPR29 a été digéré par *Eco47III* et *Sa/I* pour libérer un fragment *Eco47III-SaII* de 498 pb contenant la partie 5' du gène codant pour la glycoprotéine gD du virus de la maladie d'Aujeszky (Souche NIA3) (fragment B).

Par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

PB101 (15 mer) (SEQ ID N° 7)

5'GATGCTGCTCGCAGC 3'

PB102 (19 mer) (SEQ ID N° 8)

10 5'GCTGCGAGCAGCATCTGCA 3'

un fragment de 15 pb contenant la séquence 5' du gène gD, du codon initial ATG jusqu'au site *Eco47III* a été reconstitué, avec création d'un site *PstI* en 5' (fragment C).

Après purification, les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *PstI* et *BglII*, pour donner le plasmide pPB098 (6076 pb) (Figure N° 5).

**Exemple 10 : Construction du plasmide pPB143 (gène Grippe porcine HA souche H1N1)**

20 Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H1N1 "SW"), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

PB107 (32 mer) (SEQ ID N° 9)

25 5'GTTCTGCAGCACCCGGGAGCAAAAGCAGGGGA 3'

PB108 (33 mer) (SEQ ID N° 10)

5'ATTGCGGCCGCTAGTAGAAACAAGGGTGTTTTT 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine HA du SIV H1N1 (Figure N° 6 et SEQ ID N° 11) sous la forme d'un fragment PCR de 1803 pb.

30 Après purification, ce fragment a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01), pour donner le vecteur pPB137 (5755 pb). Le vecteur pPB137 a été digéré par *EcoRV* et *NotI* pour libérer un fragment

EcoRV-NotI de 1820 pb contenant le gène HA. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *EcoRV* et *NotI*, pour donner le plasmide pPB143 (6726 pb) (Figure N° 7).

**5 Exemple 11 : Construction du plasmide pPB142 (gène Grippe porcine NP souche H1N1)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H1N1 "SW"), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les

10 oligonucléotides suivants:

PB097 (36 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGACATC 3'

PB098 (33 mer) (SEQ ID N° 13)

5'TTGCGGCCGCTGTAGAAACAAGGGTATTTTCT 3'

15 en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine NP du SIV H1N1 (Figure N° 8 et SEQ ID N° 14) sous la forme d'un fragment *Sall*-*NotI*. Après purification le produit de RT-PCR de 1566 pb a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01), pour donner le vecteur pPB127 (5519 pb).

20 Le vecteur pPB127 a été digéré par *SaII* et *NotI* pour libérer un fragment *Sall*-*NotI* de 1560 pb contenant le gène NP. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *SaII* et *NotI*, pour donner le plasmide pPB142 (6451 pb) (Figure N° 9).

**25 Exemple 12 : Construction du plasmide pPB144 (gène Grippe porcine HA souche H3N2)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H3N2 Côtes du Nord 1987), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et

30 avec les oligonucléotides suivants:

PB095 (31 mer) (SEQ ID N° 15)

5'GTTCTGCAGGCAGGGGATAATTCTATCAACC 3'

PB096 (36 mer) (SEQ ID N° 16)

5'TTGCGGCCGCAAGGGTGT TTTTAATTACTAATATAC 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine HA du SIV H3N2 (Figure N° 10 et SEQ ID N° 17) sous la forme d'un fragment PstI-NotI. Après  
5 purification, le produit de RT-PCR de 1765 pb a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01) pour donner le vecteur pPB120 (5716 pb).

Le vecteur pPB120 a été digéré par NotI pour libérer un fragment NotI-NotI de 1797 pb contenant le gène HA. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le  
10 vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par NotI, pour donner le plasmide pPB144 (6712 pb) contenant le gène HA H3N2 dans l'orientation correcte par rapport au promoteur (Figure N° 11).

**Exemple 13 : Construction du plasmide pPB132 (gène Grippe porcine NP  
15 souche H3N2)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H3N2 Côtes du Nord 1987), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

20 PB097 (36 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGACATC 3'

PB098 (33 mer) (SEQ ID N° 13)

5'TTGCGGCCGCTGTAGAAACAAGGGTATTTTCT 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine NP du SIV H3N2  
25 (Figure N° 12 et SEQ ID N° 18) sous la forme d'un fragment Sall-NotI. Après purification le produit de RT-PCR de 1564 pb a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01) pour donner le vecteur pPB123 (5485 pb).

Le vecteur pPB123 a été digéré par Sall et NotI pour libérer un fragment Sall-  
30 NotI de 1558 pb contenant le gène NP. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par Sall et NotI, pour donner le plasmide pPB132 (6449 pb) (Figure N° 13).

**Exemple 14 : Construction du plasmide pAB025 (gène PRRSV ORF5) souche Lelystad.**

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche Lelystad) (J. Meulenberg *et al.* Virology. 1993. 19. 62-72), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB055 (34 mer) (SEQ ID N° 19)

5'ACGCGTCGACAATATGAGATGTTCTCACAAATTG 3'

AB056 (33 mer) (SEQ ID N° 20)

10 5'CGCGGATCCCGTCTAGGCCTCCCATTGCTCAGC 3'

en vue d'isoler précisément le gène "ORF5" codant pour la glycoprotéine d'enveloppe E (gp25) du virus PRRS souche Lelystad. Après purification, le produit de RT-PCR de 630 pb a été digéré par *Sa*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Sa*I-*Bam*HI de 617 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur  
15 pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB025 (5486 pb) (Figure N° 14).

**Exemple 15 : Construction du plasmide pAB001 PRRSV ORF5 souche USA**

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été  
20 réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche ATCC-VR2332) (M. Murtaugh *et al.* Arch Virol. 1995. 140. 1451-1460), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB001 (30 mer) (SEQ ID N° 21)

5'AACTGCAGATGTTGGAGAAATGCTTGACCG 3'

25 AB002 (30 mer) (SEQ ID N° 22)

5'CGGGATCCCTAAGGACGACCCCATTTGTTCC 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe E ("gp25") du virus PRRS souche ATCC-VR2332. Après purification, le produit de RT-PCR de 620 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment  
30 *Pst*I-*Bam*HI de 606 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB001 (5463 pb) (Figure N° 15).

Exemple 16 : Construction du plasmide pAB091 (gène PPRSV ORF3) souche Lelystad.

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche Lelystad) (J. Meulenberg *et al.* Virology. 1993. 19. 62-72), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB170 (32 mer) (SEQ ID N° 23)

5'AAACTGCAGCAATGGCTCATCAGTGTGCACGC 3'

AB171 (30 mer) (SEQ ID N° 24)

10 5'CGCGGATCCTTATCGTGATGTACTGGGGAG 3'

en vue d'isoler précisément le gène "ORF3" codant pour la glycoprotéine d'enveloppe "gp45" du virus PRRS souche Lelystad. Après purification, le produit de RT-PCR de 818 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 802 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur  
15 pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB091 (5660 pb) (Figure N° 16).

Exemple 17 : Construction du plasmide pAB092 (gène PPRSV ORF3 souche USA.

20 Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche ATCC-VR2332) (M. Murtaugh *et al.* Arch Virol. 1995. 140. 1451-1460), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB172 (32 mer) (SEQ ID N° 25)

25 5'AAACTGCAGCAATGGTTAATAGCTGTACATTC 3'

AB173 (32 mer) (SEQ ID N° 26)

5'CGCGGATCCCTATCGCCGTACGGCACTGAGGG 3'

en vue d'isoler précisément le gène "ORF3" codant pour la glycoprotéine d'enveloppe "gp45" du virus PRRS souche ATCC-VR2332. Après purification,  
30 le produit de RT-PCR de 785 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 769 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exempl 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner

le plasmide pAB092 (5627 pb) (Figure N° 17).

**Exemple 18 : Construction du plasmide pAB004 (gène Parvovirus porcin VP2).**

Une réaction RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée

- 5 avec l'ARN génomique du parvovirus porcin (Souche NADL2) (J. Vasudevacharya *et al.* Virology. 1990. 178. 611-616), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB007 (33 mer) (SEQ ID N° 27)

5'AAAACTGCAGAATGAGTGAAAATGTGGAACAAC 3'

- 10 AB010 (33 mer) (SEQ ID N° 28)

5'CGCGGATCCCTAGTATAATTTCTTGGTATAAG 3'

pour amplifier un fragment de 1757 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 du parvovirus porcin. Après purification le produit de RT-PCR a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour donner un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 1740 pb.

- 15 Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB004 (6601 pb) (Figure N° 18).

**Exemple 19 : Construction du plasmide pAB069 (gène Peste porcine HCV E1).**

- 20 Une réaction RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la peste porcine (Hog Cholera Virus) (HCV) (Souche Alfort) (G. Meyers *et al.*, Virology. 1989. 171. 18-27), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB126 (36 mer) (SEQ ID N° 29)

- 25 5'ACGCGTCGACATGAACTAGAAAAAGCCCTGTTGGC 3'

AB127 (34 mer) (SEQ ID N° 30)

5'CGCGGATCCTCATAGCCGCCCTTGTGCCCCGGTC 3'

pour isoler la séquence codant pour la protéine E1 du virus HCV sous la forme d'un fragment RT-PCR de 1363 pb. Après purification, ce fragment a été digéré

- 30 par *Sa*II et *Bam*HI pour donner un fragment *Sa*II-*Bam*HI de 1349 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*II et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB069 (6218 pb) (Figure

N° 19).

**Exemple 20 : Construction du plasmide pAB061 (gène Peste porcine HCV E2).**

Une réaction RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée

- 5 avec l'ARN génomique du virus de la peste porcine (Hog Cholera Virus) (HCV) (Souche Alfort) (G. Meyers *et al.*, Virology, 1989, 171, 18-27), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB118 (36 mer) (SEQ ID N° 31)

5'ACGCGTCGACATGTCAACTACTGCGTTTCTCATTTG 3'

- 10 AB119 (33 mer) (SEQ ID N° 32)

5'CGCGGATCCTCACTGTAGACCAGCAGCGAGCTG 3'

- pour isoler la séquence codant pour la protéine E2 du virus HCV sous la forme d'un fragment RT-PCR de 1246 pb. Après purification, ce fragment a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour donner un fragment *Sall*-*Bam*HI de 1232 pb. Ce
- 15 fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB061 (6101 pb) (Figure N° 20).

- Exemple 21 : Construction du plasmide pPB162 (gène *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxl délété).**
- 20

Le gène apxl d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 719 et 846.

- Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 1) (J. Frey *et al.*, Infect. Immun. 1991, 59, 3026-3032), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les
- 25 oligonucléotides suivants:

PB174 (32 mer) (SEQ ID N° 33)

5'TTGTCGACGTAAATAGCTAAGGAGACAACATG 3'

- 30 PB189 (29 mer) (SEQ ID N° 34)

5'TTGAATTCTTCTTCAACAGAATGTAATTC 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxl codant pour la protéine hémolysine I d'



*Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment Sall-EcoRI. Après purification, le produit de PCR de 2193 pb a été digéré par *SaI* et *EcoRI* pour isoler un fragment Sall-EcoRI de 2183 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 1) (J. Frey *et al.*, Infect. Immun. 1991. 59. 3026-3032) et avec les oligonucléotides suivants:

PB190 (31 mer) (SEQ ID N° 35)

5'TTGAATTCTATCGCTACAGTAAGGAGTACGG 3'

PB175 (31 mer) (SEQ ID N° 36)

10 5'TTGGATCCGCTATTTATCATCTAAAAATAAC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène *apxl* codant pour la protéine hémolysine I d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment EcoRI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 576 pb a été digéré par *EcoRI* et *BamHI* pour isoler un fragment EcoRI-BamHI de 566 pb (fragment B). Les fragments  
15 A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *SaI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pPB162 (7619 pb) (Figure N° 21).

Exemple 22 : Construction du plasmide pPB163 (gène *Actinobacillus pleuropneumoniae* *apxII* délété).  
20

Le gène *apxII* d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 716 et 813.

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 9) (M. Smits *et al.*, Infection and Immunity. 1991. 59. 4497-4504), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3,  
25 et avec les oligonucléotides suivants:

PB176 (31 mer) (SEQ ID N° 37)

5'TTGTCGACGATCAATTATATAAAGGAGACTC 3'

30 PB191 (30 mer) (SEQ ID N° 38)

5'TTGAATTCCTCTTCAACTGATTTGAGTGAG 3'

pour amplifier la partie 5' du gène *apxII* codant pour la protéine hémolysine II

d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment Sall-EcoRI. Après purification, le produit de PCR de 2190 pb a été digéré par Sall et EcoRI pour isoler un fragment Sall-EcoRI de 2180 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 9) (M. Smits *et al.*, Infection and Immunity. 1991, 59. 4497-4504) et avec les oligonucléotides suivants:

PB192 (29 mer) (SEQ ID N° 39)

5'TTGAATTCGTAAATCTTAAAGACCTCACC 3'

PB177 (30 mer) (SEQ ID N° 40)

10 5'TTGGATCCACCATAGGATTGCTATGATTTG 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxII codant pour la protéine hémolysine II d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment EcoRI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 473 pb a été digéré par EcoRI et BamHI pour isoler un fragment EcoRI-BamHI de 463 pb (fragment B).

15 Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB163 (7513 pb) (Figure N° 22).

Exemple 23 : Construction des plasmides pPB174', pPB189 et pPB190 (gène

20 *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIII délété).

Premier exemple de délétion dans AxIII (plasmide pPB174') :

Le gène apxIII d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 733 et 860.

25

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

30 PB278 (30 mer) (SEQ ID N° 41)

5'TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB279 (29 mer) (SEQ ID N° 42)

5' TTTATCGATTCTTCTACTGAATGTAATTC 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment Sall-ClaI.

Après purification, le produit de PCR de 2216 pb a été digéré par Sall et ClaI

5 pour isoler un fragment Sall-ClaI de 2205 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815) et avec les oligonucléotides suivants:

PB280 (33 mer) (SEQ ID N° 43)

10 5' TTTATCGATTTATGTTTATCGTTCCACTTCAGG 3'

PB307 (32 mer) (SEQ ID N° 44)

5' TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment ClaI-BamHI.

15 Après purification, le produit de PCR de 596 pb a été digéré par ClaI et BamHI pour isoler un fragment ClaI-BamHI de 583 pb (fragment B).

Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7); préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB174' (7658 pb) (Figure N° 23).

20

**Deuxième exemple de délétion dans ApxIII (plasmide pPB189) :**

Le gène apxIII d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 705 et 886.

25 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB278 (30 mer) (SEQ ID N° 41)

30 5' TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB303 (32 mer) (SEQ ID N° 45)

5' TTTATCGATTTCTTCACGTTTACCAACAGCAG 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment Sall-ClaI. Après purification, le produit de PCR de 2133 pb a été digéré par Sall et ClaI pour isoler un fragment Sall-ClaI de 2122 pb (fragment A).

- 5 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815) et avec les oligonucléotides suivants:

PB306 (31 mer) (SEQ ID N° 46)

5'TTTATCGATTCTGATTTTTCCTTCGATCGTC 3'

- 10 PB307 (32 mer) (SEQ ID N° 44)

5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment ClaI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 518 pb a été digéré par ClaI et BamHI

- 15 pour isoler un fragment ClaI-BamHI de 506 pb (fragment B).

Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB189 (7496 pb) (Figure N° 24).

- 20 Troisième exemple de délétion dans ApxIII (plasmide pPB190) :

Le gène apxIII d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 718 et 876.

- 25 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB278 (30 mer) (SEQ ID N° 41)

5'TTTGTGCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

- 30 PB304 (33 mer) (SEQ ID N° 47)

5'TTTATCGATACCTGATTGCGTTAATTCATAATC 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III

d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment Sall-ClaI. Après purification, le produit de PCR de 2172 pb a été digéré par *SaI* et *Clal* pour isoler un fragment Sall-ClaI de 2161 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815) et avec les oligonucléotides suivants:

PB305 (31 mer) (SEQ ID N° 48)

5'TTTATCGATAAATCTAGTGATTAGATAAAC 3'

PB307 (32 mer) (SEQ ID N° 44)

10 5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène *apxIII* (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment ClaI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 548 pb a été digéré par *Clal* et *Bam*HI pour isoler un fragment ClaI-BamHI de 536 pb (fragment B).

15 Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *SaI* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pPB190 (7565 pb) (Figure N° 25).

#### Exemple 24 : Préparation et purification des plasmides

20 Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on peut utiliser toute technique permettant d'obtenir une suspension de plasmides purifiés majoritairement sous forme superenroulée. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer en particulier la technique de lyse alcaline suivie de deux ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure

25 de césium en présence de bromure d'éthidium telle que décrite dans J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). On peut se référer également aux demandes de brevet PCT WO 95/21250 et PCT WO 96/02658 qui décrivent des méthodes pour produire à l'échelle industrielle des

30 plasmides utilisables pour la vaccination. Pour les besoins de la fabrication des vaccins (voir exemple 17), les plasmides purifiés sont resuspendus de manière à obtenir des solutions à haute concentration ( > 2 mg/ml)-compatibles avec

le stockage. Pour ce faire, les plasmides sont resuspendus soit en eau ultrapure, soit en tampon TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

#### Exemple 25 : Fabrication des vaccins associés

- 5 Les divers plasmides nécessaires à la fabrication d'un vaccin associé sont mélangés à partir de leurs solutions concentrées (exemple 16). Les mélanges sont réalisés de telle manière que la concentration finale de chaque plasmide corresponde à la dose efficace de chaque plasmide. Les solutions utilisables pour ajuster la concentration finale du vaccin peuvent être soit une solution
- 10 NACI à 0,9 % , soit du tampon PBS.

Des formulations particulières telles que les liposomes, les lipides cationiques, peuvent aussi être mises en oeuvre pour la fabrication des vaccins.

#### Exemple 26 : Vaccination des porcs

- 15 Les porcs sont vaccinés avec des doses de 100  $\mu$ g, 250  $\mu$ g ou 500  $\mu$ g par plasmide.

Les injections peuvent être réalisées à l'aiguille par voie intramusculaire. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous un volume de 2 ml.

- Les injections peuvent être réalisées par voie intradermique en utilisant un
- 20 appareil d'injection à jet liquide (sans aiguille) délivrant une dose de 0,2 ml en 5 points (0,04 ml par point d'injection) (par exemple, appareil "PIGJET"). Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous des volumes de 0,2 ou 0,4 ml, ce qui correspond respectivement à une ou à deux administrations. Lorsque deux administrations successives sont pratiquées au moyen de l'appareil
- 25 PIGJET, ces administrations sont réalisées de manière décalée, de façon à ce que les deux zones d'injection soient séparées l'une de l'autre par une distance d'environ 1 à 2 centimètres.

## REVENDEICATIONS

1. Formule de vaccin porcin contre la pathologie respiratoire et/ou de reproduction des porcs, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène porcin, ces valences étant choisies parmi deux groupes consistant en virus de la maladie d'Aujeszky, virus de la grippe porcine, virus de la maladie mystérieuse du porc, virus de la parvovirose, virus de la peste porcine classique et bactérie responsable de l'actinobacillose, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la maladie d'Aujeszky, HA, NP, N pour le virus de la grippe porcine, E, ORF3, M pour le virus de la maladie mystérieuse, VP2 pour le virus de la parvovirose, E1, E2 pour le virus de la pestivirose et apxI, apxII et apxIII pour l'actinobacillose.

2. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les valences Aujeszky et grippe porcine.

3. Formule de vaccin selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus l'une au moins des valences choisies parmi maladie mystérieuse et actinobacillose.

4. Formule de vaccin selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la valence peste porcine classique.

5. Formule de vaccin selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus au moins une valence choisie parmi le groupe des valences maladie mystérieuse, parvovirose et peste porcine classique.

6. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène HA et/ou NP du virus de la grippe porcine.

7. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène E et/ou ORF3 du virus de la maladie mystérieuse.

8. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend gB et gD d'Aujesky.

9. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle se présente sous un volume de dose compris entre 0,1 et 10 ml, de préférence entre 1 et 5 ml.

5 10. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est adaptée à une administration intradermique par jet liquide, de préférence par jets multiples, sous un volume de dose compris entre 0,1 et 0,9 ml, en particulier entre 0,2 et 0,6 ml, de préférence entre 10 0,4 et 0,5 ml.

11. Formule de vaccin selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10 ng et 1 mg, de préférence entre 100 ng et 500 µg, plus préférentiellement encore entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

15 12. Utilisation d'une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les porcins primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, 20 vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée.

25 13. Kit de vaccination regroupant une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, et un vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée, pour une administration de ce dernier en 30 primo-vaccination et pour un rappel avec la formule de vaccin.

35 14. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, accompagnée d'une notice indiquant que cette formule est utilisable en rappel d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée.



1/31

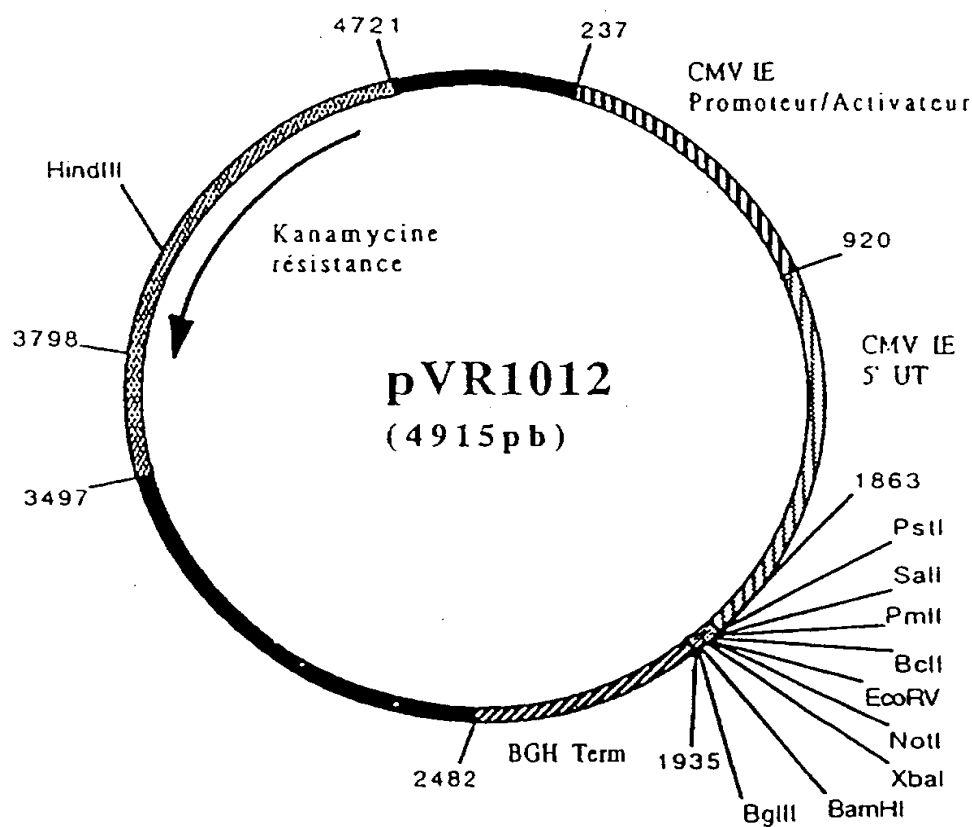


Figure N° 1

2/31

1 ATGCCCCGCTGGTGGCGGTCTTTGGCGCGGGCCCCGGGGGCATCGGCCCCGGGCACCACGGCGGT  
 1 MetProAlaGlyGlyGlyLeuTrpArgGlyProArgGlyHisArgProGlyHisHisGlyGly  
 PstI  
 64 GCTGGCCTCGGACGTCTTTGGCCTGCTCCACACCACGCTGCAGCTGCGCGGGGCGCCCTCGCG  
 22 AlaGlyLeuGlyArgLeuTrpProAlaProHisHisAlaAlaAlaAlaArgGlyAlaValAla  
 127 CTAGCGCTGCTGCTGCTGGCGCTCGCCCGGGCCCCCGCCGTGCGGCGCGGGCGCCGTGACGCGG  
 43 LeuAlaLeuLeuLeuLeuAlaLeuAlaAlaAlaProProCysGlyAlaAlaAlaValThrArg  
 190 GCCGCCTCGGCCTCGCCGACGCCCCGGGACGGGCGCCACCCCCAACGACGTCTCCGCGGAGGCC  
 64 AlaAlaSerAlaSerProThrProGlyThrGlyAlaThrProAsnAspValSerAlaGluAla  
 XhoI  
 253 TCCCTCGAGGAGATCGAGGCGTTCTCCCCCGGCCCTCGGAGGCCCCCGACGGCGAGTACGGC  
 85 SerLeuGluGluIleGluAlaPheSerProGlyProSerGluAlaProAspGlyGluTyrGly  
 316 GACCTGGACGCGCGGACGGCCGTGCGCGCGGCGCGACCGAGCGGGACCGCTTCTACGCTGTC  
 106 AspLeuAspAlaArgThrAlaValArgAlaAlaAlaThrGluArgAspArgPheTyrValCys  
 379 CCGCCCGCGTCCGGCTCCACGGTGGTGGCGCTGGAGCCCGAGCAGGCCTGCCCGGAGTACTCG  
 127 ProProProSerGlySerThrValValArgLeuGluProGluGlnAlaCysProGluTyrSer  
 442 CAGGGGCGCAACTTCACGGAGGGGATCGCCCTGCTCTTCAAGGAGAACATCGCCCCGACAAG  
 148 GlnGlyArgAsnPheThrGluGlyIleAlaLeuLeuPheLysGluAsnIleAlaProHisLys  
 505 TTCAAGGCCCCACATCTACTACAAGAACGTCATCGTCACGACCGTGTGGTCCGGGAGCACGTAC  
 169 PheLysAlaHisIleTyrTyrLysAsnValIleValThrThrValTrpSerGlySerThrTyr  
 568 GCGCCATCACGAACCGCTTCACAGACCGCGTCCCGTCCCGTGCAGGAGATCACGGACGTG  
 190 AlaAlaIleThrAsnArgPheThrAspArgValProValProValGlnGluIleThrAspVal  
 631 ATCGACCGCGCGGCAAGTGGCTCTCCAAGGCCGAGTACGTGCGCAACAACCACAAGGTGACC  
 211 IleAspArgArgGlyLysCysValSerLysAlaGluTyrValArgAsnAsnHisLysValThr  
 694 GCCTTCGACCGCGACGAGAACCCCGTGGAGGTGGACCTGCGCCCCCTCGCGCCTGAACGCGCTC  
 232 AlaPheAspArgAspGluAsnProValGluValAspLeuArgProSerArgLeuAsnAlaLeu  
 757 GGCACCCGCGCCTGGCACACCACCAACGACACCTACACCAAGATCGGCGCCCGGGGCTTCTAC  
 253 GlyThrArgAlaTrpHisThrThrAsnAspThrTyrThrLysIleGlyAlaAlaGlyPheTyr  
 820 CACACGGGCACCTCCGTCACCTGCATCGTCGAGGAGGTGGAGGCGCGCTCCGTGTACCCCTAC  
 274 GlnThrGlyThrSerValAsnCysIleValGluGluValGluAlaArgSerValTyrProTyr  
 883 GACTCCTTCGCCCTGTCCACGGGGGACATTGTGTATGTCCCCCTTCTACGGCCTGCGCGAG  
 295 AspSerPheAlaLeuSerThrGlyAspIleValTyrMetSerProPheTyrGlyLeuArgGlu  
 946 GGGGCCCCGCGGAGCAGATCGGCTACGCGCCCGGGCGCTTCCAGCAGGTGGAGCACTACTAC  
 316 GlyAlaHisGlyGluGlnIleGlyTyrAlaProGlyArgPheGlnGlnValGluHisTyrTyr  
 1009 CCCATCGACCTGGACTCGCGCCTCCGCGCCTCCGAGAGCGTGACGCGCAACTTCTACGCACG  
 337 ProIleAspLeuAspSerArgLeuArgAlaSerGluSerValThrArgAsnPheLeuArgThr  
 1072 CCGCACTTCACGCTGGCCTGGGACTGGGCCCCCAAGACGCGCGCGCTGTGCAGCCTGGCCAAG  
 358 ProHisPheThrValAlaTrpAspTrpAlaProLysThrArgArgValCysSerLeuAlaLys  
 1135 TGGCGCGAGGCGGAGGAGATGACCCGCGACGAGACGCGCGACCGCTCCTTCCGCTTCACGTG  
 379 TrpArgGluAlaGluGluMetThrArgAspGluThrArgAspGlySerPheArgPheThrSer  
 PstI  
 1198 CGGCCCCGCGGCGCTCTTCGTCAGCGACGTACCGCAGCTGGACCTGCAGCGCGTGCACCTG  
 400 ArgAlaLeuGlyAlaSerPheValSerAspValThrGlnLeuAspLeuGlnArgValHisLeu  
 1261 GCGCACTGCGCTCTCCGCGAGGCTCCGAGGCCATCGACGCCATCTACCGCGCGCGCTACAAC  
 421 GlyAspCysValLeuArgGluAlaSerGluAlaIleAspAlaIleTyrArgArgArgTyrAsn  
 1324 ACCACGCACGTGCTGGCCGCGACAGGCCCGAGGTGTACCTCGCCCCGCGGCGCTTCGTGGTG  
 442 SerThrHisValLeuAlaGlyAspArgProGluValTyrLeuAlaArgGlyGlyPheValVal

Figure N° 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/31

1387 GCCTTCGCGCCGCTGATCTCGAACGAGCTGGCGCAGCTGTACGCGCGCGAGCTCGAGCGCCTC XhoI  
 463▶ AlaPheArgProLeuIleSerAsnGluLeuAlaGlnLeuTyrAlaArgGluLeuGluArgLeu  
 1450 GGCCTCGCGCGCGCTCGTGGGCCCCGCGGCCCCCGCGGCCCCCGCTCGGCCCCGCGCTCCCCC  
 484▶ GlyLeuAlaGlyValValGlyProAlaAlaProAlaAlaAlaArgArgAlaArgArgSerPro  
 1513 GGCCCGCGCGGACGCCCCGAGCCGCGCGCGCTCAACGGCACGGGGCACCTGCGCATCACCAGC  
 505▶ GlyProAlaGlyThrProGluProProAlaValAsnGlyThrGlyHisLeuArgIleThrThr  
 PsII  
 1576 GGCTCGGCGGAGTTTGCGCGCCTGTCAGTTCACCTACGACCACATCCAGGCGCACGTGAACGAC  
 526▶ GlySerAlaGluPheAlaArgLeuGlnPheThrTyrAspHisIleGlnAlaHisValAsnAsp  
 PsII  
 1639 ATGCTGGGCGCATCGCGGCCGCTGGTGGCAGCTGCAGAACAAGGACCGCACCTGTGGAGC  
 547▶ MetLeuGlyArgIleAlaAlaAlaTrpCysGluLeuGlnAsnLysAspArgThrLeuTrpSer  
 1702 GAGATGTGCGCCTGAACCCCGCGCGCTGGCCACGCGCGCTCGGCCAGCGCGTCTGCGCG  
 568▶ GluMetSerArgLeuAsnProSerAlaValAlaThrAlaAlaLeuGlyGlnArgValCysAla  
 1765 CGCATGCTCGGCGACGTGATGGCCATCTCGCGGTGCGTGGAGGTGCGCGCGCGCGTGTACGT  
 589▶ ArgMetLeuGlyAspValMetAlaIleSerArgCysValGluValArgGlyGlyValTyrVal  
 1828 CAGAACTCCATGCGCGTGGCCGCGGAGCGCGGCACGTGCTACAGCCGCGCGCTGGTCACCTTC  
 610▶ GlnAsnSerMetArgValProGlyGluArgGlyThrCysTyrSerArgProLeuValThrPhe  
 1891 GAGCACAACGGCACGGGCGTGATCGAGCGCCAGCTCGGCGACGACAACGAGCTCCTCATCTCG  
 631▶ GluHisAsnGlyThrGlyValIleGluGlyGlnLeuGlyAspAspAsnGluLeuLeuIleSer  
 1954 CGCGACCTCATCGAGCCCTGCACCGGCAACCACCGCGCTACTTTAAGCTGGGGAGCGGGTAC  
 652▶ ArgAspLeuIleGluProCysThrGlyAsnHisArgArgTyrPheLysLeuGlySerGlyTyr  
 2017 GTGTACTACGAGGACTACAACCTACGTGCGCATGCTGGAGGTGCCCCGAGACGATCAGCACGCGG  
 673▶ ValTyrTyrGluAspTyrAsnTyrValArgMetValGluValProGluThrIleSerThrArg  
 XhoI  
 2080 GTTACCCTGAACCTGACGCTGCTGGAGGACCGCGAGTTCTTCCCCCTCGAGGTGTACACGGC  
 694▶ ValThrLeuAsnLeuThrLeuLeuGluAspArgGluPheLeuProLeuGluValTyrThrArg  
 2143 GAGGAGCTCGCCGACACGGGCTCTTGGACTACAGCGAGATCCAGCGCCGCAACAGCTGCAC  
 715▶ GluGluLeuAlaAspThrGlyLeuLeuAspTyrSerGluIleGlnArgArgAsnGlnLeuHis  
 2206 GCGCTCAAGTTCTACGACATCGACCGCGTGGTCAAGGTGGACCACAACGTGGTGTCTGCGC  
 736▶ AlaLeuLysPheTyrAspIleAspArgValValLysValAspHisAsnValValLeuLeuArg  
 2269 GGCATCGCCAACCTTCTTCCAGGGCCTCGGCGACGTGGGCGCGCGCGTGGCAAGGTGGTCTCTG  
 757▶ GlyIleAlaAsnPhePheGlnGlyLeuGlyAspValGlyAlaAlaValGlyLysValValLeu  
 2332 GGTGCCACGGGGCGGTGATCTCGGCGCTCGGCGGCATGGTGTCTTCTGTTCCAACCCCTTC  
 778▶ GlyAlaThrGlyAlaValIleSerAlaValGlyGlyMetValSerPheLeuSerAsnProPhe  
 2395 GGGCGCTCGCCATCGGGCTGCTGGTGTGGTGGCGCGCTGGTGGCGGCTTCTGGCCTACCGG  
 799▶ GlyAlaLeuAlaIleGlyLeuLeuValLeuAlaGlyLeuValAlaAlaPheLeuAlaTyrArg  
 2458 CACATCTCGCGCTGCGCGCAACCCCATGAAGGCCCTGTACCCCGTCACGACGAAGACGCTC  
 820▶ HisIleSerArgLeuArgArgAsnProMetLysAlaLeuTyrProValThrThrLysThrLeu  
 Sall  
 2521 AAGGAGGACGGCGTCGACGAAGGCGACGTGGACGAGGCCAAGCTGGACCAGGCCCGGGACATG  
 841▶ LysGluAspGlyValAspGluGlyAspValAspGluAlaLysLeuAspGlnAlaArgAspMet  
 XhoI  
 2584 ATCCGGTACATGTCCATCGTGTGCGGCCCTCGAGCAGCAGGAGCACAAGGCGCGCAAGAAGAAC  
 862▶ IleArgTyrMetSerIleValSerAlaLeuGluGlnGlnGluHisLysAlaArgLysLysAsn  
 2647 AGCGGGCGCGCTGCTGCGCCAGCCGCGTGGGGCGATGGCCACGCGCGCGCGGCGACTACCAG  
 883▶ SerGlyProAlaLeuLeuAlaSerArgValGlyAlaMetAlaThrArgArgArgHisTyrGln  
 XhoI  
 2710 CGCCTCGAGAGCGGACGACCCCGACGCCCTGTAG  
 904▶ ArgLeuGluSerGluAspProAspAlaLeu...

Figure N°2 (suite et fin)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/31

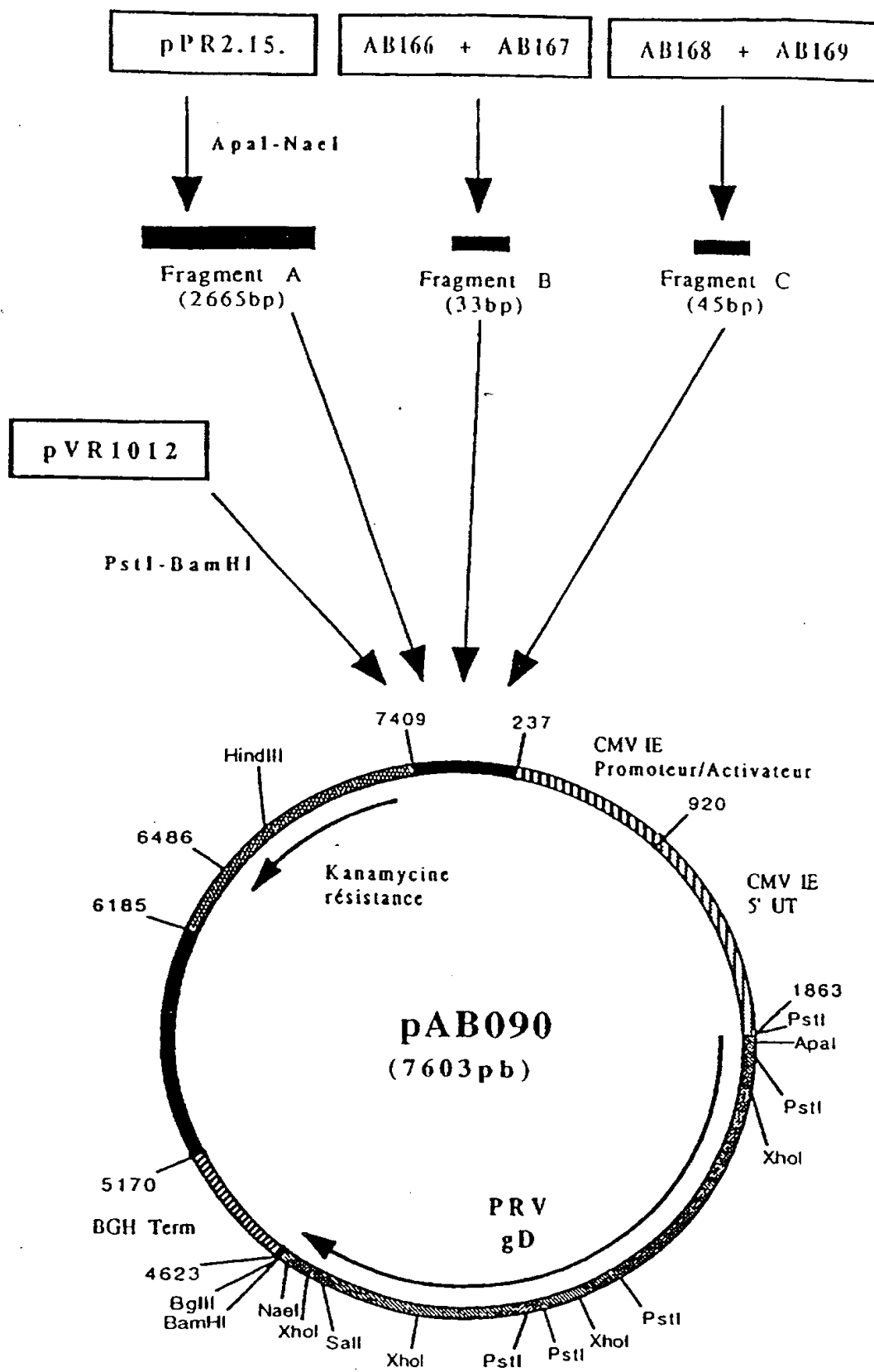


Figure N° 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/31

1 ATGCTGCTCGCAGCGCTATTTGGCGGCGCTGGTGGCCCCGACGACCGCTCGGTGCGGACGTGGAC  
1 MetLeuLeuAlaAlaLeuLeuAlaAlaLeuValAlaArgThrThrLeuGlyAlaAspValAsp

64 GCCGTGCCCCGCGCGACCTTCCCCCGCGCGGTACCCGTACACCGAGTCGTGGCAGCTGACG  
22 AlaValProAlaProThrPheProProProAlaTyrProTyrThrGluSerTrpGlnLeuThr

127 CTGACGACGGTCCCCCTCGCCCTTCGTGCGCCCCGCGGACGTCTACCACACGCGCCCCGCTGGAG  
43 LeuThrThrValProSerProPheValGlyProAlaAspValTyrHisThrArgProLeuGlu

190 GACCCGTGCGGGGTGGTGGCGCTGATCTCCGACCCGCGAGGTGGACCGCTGCTGAACGAGGCG  
64 AspProCysGlyValValAlaLeuIleSerAspProGlnValAspArgLeuLeuAsnGluAla

253 GTGGCCACCGCGCGCCACGTACCGCGCCACGTGGCCTGGTACCGCATCGCGGACCGGTGC  
85 ValAlaHisArgArgProThrTyrArgAlaHisValAlaTrpTyrArgIleAlaAspGlyCys

316 GCACACCTGCTGTACTTTATCGAGTACGCCGACTGCGACCCCGAGGCAGGCAGATCTTTGGGCG  
106 AlaHisLeuLeuTyrPheIleGluTyrAlaAspCysAspProArgGlnAlaAspLeuTrpAla

379 CTGCCGCGCGCGCACCCACGCCGATGTGGTGGACCCCGTCCGCGGACTACATGTTCCCCACGGA  
127 LeuProAlaProHisHisAlaAspValValAspProValArgGlyLeuHisValProHisGly

442 GGACGACCTGGGGCTGCTCATGGTGGCCCCCGGGCGTTCAACGAGGGCCAGTACCGGCGCCT  
148 GlyArgAlaGlyAlaAlaHisGlyGlyProArgAlaValGlnArgGlyProValProAlaPro

505 GGTGTCCGTCCGACGGCGTGAACATCCTCACCAGCTTCATGGTGGCGCTCCCCGAGGGGCAAGA  
169 GlyValArgArgArgArgGluHisProHisArgLeuHisGlyGlyAlaProArgGlyAlaArg

568 GTGCCCCGTTGCCCCGCGTGGACCAAGTTCGGCGCGTGGTGGAGCGACGA  
190 ValProValArgProArgGlyProAlaProHisValGlnValArgArgValLeuGluArgArg

631 CAGCTTCAAGCGGGCGTGGACGTGATGCGATTCTTGACGCGCTTCTACCAGCAGCCCCCGCA  
211 GlnLeuGlnAlaGlyArgGlyArgAspAlaIleProAspAlaValLeuProAlaAlaProAla

694 CCGGGAGGTGGTGAACACTACTGGTACCGCAAGAACGGCCGGACGCTCCCGCGGGCCCCACGCCGC  
232 ProGlyGlyGlyGluLeuLeuValProGlnGluArgProAspAlaProAlaGlyProArgArg

757 CGCCACGCCGTACGCCATCGACCCCGCGCGGCCCTCGGCGGGCTCGCCGAGGCCCCCGCCCCG  
253 ArgHisAlaValArgHisArgProArgAlaAlaLeuGlyGlyLeuAlaGluAlaProAlaPro

820 GCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCGAAGCCCGAGCCCGCCCCGGCGACGCCCGCGCCCCCGACCG  
274 AlaProAlaProAlaProAlaGluAlaArgAlaArgProGlyAspAlaArgAlaProArgPro

883 CCTGCCCCGAGCCGGCGACGCGGGACCACGCCCGCGGGGGCGCCCCACGCCCGGACCCCCGAG  
295 ProAlaArgAlaGlyAspAlaGlyProArgArgArgGlyProProHisAlaAlaThrProGlu

946 GCCCCGAGACGCCGCACCGCCCCCTTCGCCCCGCGGGCGTCTGCGCCAGCGGGTGGCCGCAGCC  
316 AlaArgAspAlaAlaProProLeuArgProAlaGlyArgArgAlaGlnArgValAlaAlaAla

1009 CGCGGAGCCGTTCCAGCCGCGGACCCCCCGCGCGCGGGCGTCTCGCGCCACCGCTCGGTGAT  
337 ArgGlyAlaValProAlaAlaAspProArgArgAlaGlyArgLeuAlaProProLeuGlyAsp

Figure N° 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/31

1072 CGTCGGCACGGGCACCGCGATGGGCGCGCTCCTGGTGGGCGTGTCGTCTACATCTTCTTCCG  
358 ArgArgHisGlyHisArgAspGlyArgAlaProGlyGlyArgValArgLeuHisLeuLeuPro  
1135 CCTGAGGGGGGCGAAGGGGTATCGCCTCCTGGGCGGTCCCGCGGACGCCGACGAGCTAAAAGC  
379 ProGluGlyGlyGluGlyValSerProProGlyArgSerArgGlyArgArgArgAlaLysSer  
1198 GCAGCCCGGTCCGTAG  
400 AlaAlaArgSerVal

Figure N° 4 (suite et fin)

7/31

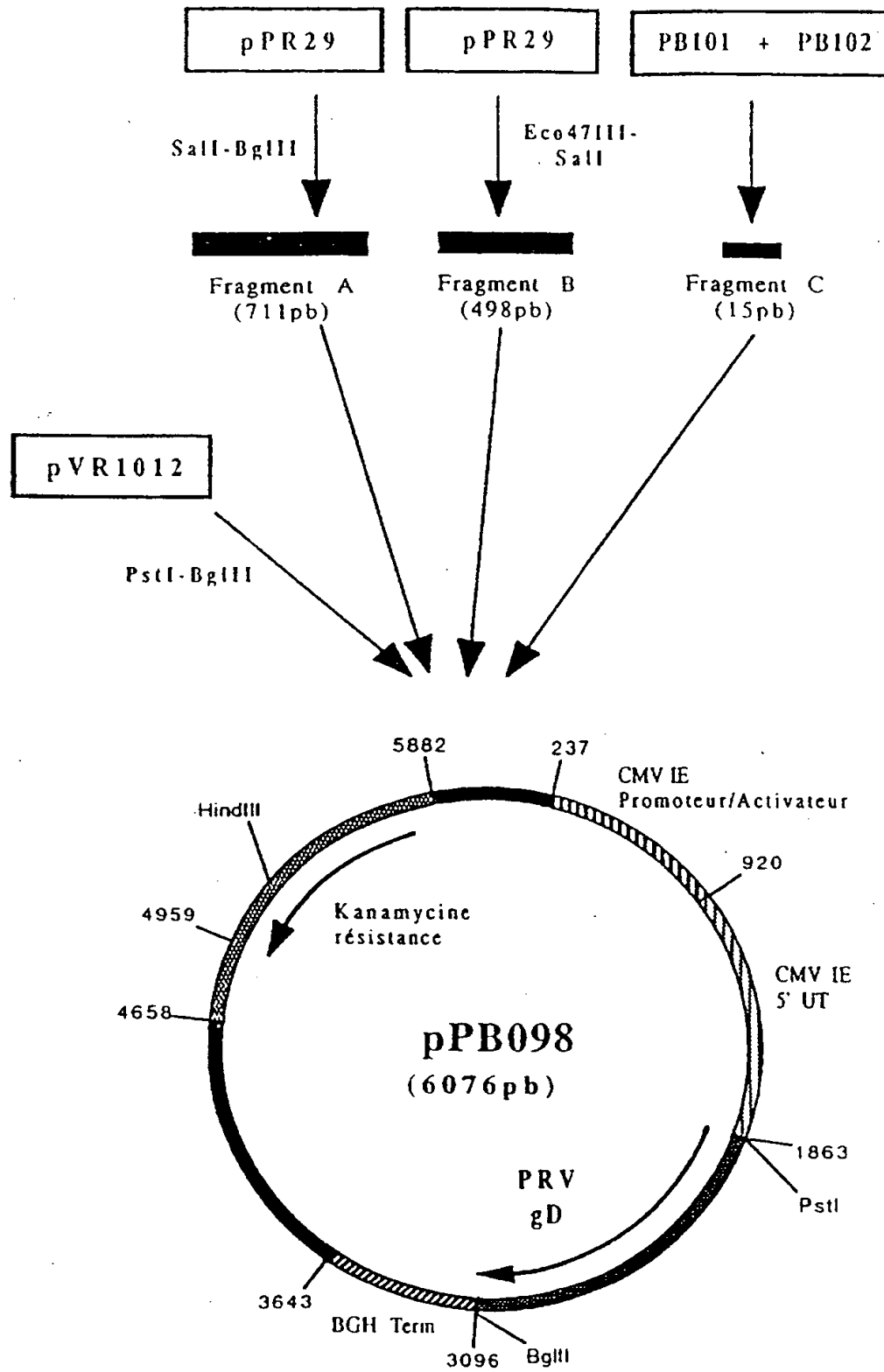


Figure N° 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8/31

1 ATGGAAGCAAACTATTTCGTATTATTCTGTACATTCACTGCGCTGAAAGCTGACACCATCTGT  
 1 ▶ MetGluAlaLysLeuPheValLeuPheCysThrPheThrAlaLeuLysAlaAspThrIleCys  
 64 GTAGGATACCATGCTAACAATTCCACAGATACTGTGCGACACAATACTGGAGAAGAATGTGACT  
 22 ▶ ValGlyTyrHisAlaAsnAsnSerThrAspThrValAspThrIleLeuGluLysAsnValThr  
 127 GTGACTCATTCAAGTTAATTTACTAGAAAACAGTCATAATGGAAGCTCTGCAGCCTGAATGGA  
 43 ▶ ValThrHisSerValAsnLeuLeuGluAsnSerHisAsnGlyLysLeuCysSerLeuAsnGly  
 190 GTAGCCCCCTTGCAACTAGGGAAGTGCAACGTAGCAGGGTGGATCCTTGGCAACCCAGAATGT  
 64 ▶ ValAlaProLeuGlnLeuGlyLysCysAsnValAlaGlyTrpIleLeuGlyAsnProGluCys  
 253 GACCTGTTGCTCACAGCGAATTCATGGTCTTACATAATAGAGACTTCAAATTCAGAAAATGGA  
 85 ▶ AspLeuLeuLeuThrAlaAsnSerTrpSerTyrIleIleGluThrSerAsnSerGluAsnGly  
 316 ACATGCTACCCCGGAGAATTCATTGATTATGAGGAATTAAGGGAGCAGCTGAGTTCAGTGTCT  
 106 ▶ ThrCysTyrProGlyGluPheIleAspTyrGluGluLeuArgGluGlnLeuSerSerValSer  
 379 TCATTGAAAAGGTTTGAAATTTTCCCAAAGCAAACATCGGCCAAATCATGAGACAACCAAA  
 127 ▶ SerPheGluArgPheGluIlePheProLysAlaAsnSerTrpProAsnHisGluThrThrLys  
 442 GGTATTACAGCTGCATGCTCTTACTCTGGAACCCCGAGTTTTTATCGGAATTTGCTATGGATA  
 148 ▶ GlyIleThrAlaAlaCysSerTyrSerGlyThrProSerPheTyrArgAsnLeuLeuTrpIle  
 505 GTAGAGAGGGAAAATTCCTATCCTAAACTCAGCAAATCATACACAAACAACAAAGGGAAAGAA  
 169 ▶ ValGluArgGluAsnSerTyrProLysLeuSerLysSerTyrThrAsnAsnLysGlyLysGlu  
 568 GTGCTTATAATCTGGGGAGTGCACCACCCTCCAACCTACCAATGACCAACAAAGCCTCTATCAG  
 190 ▶ ValLeuIleIleTrpGlyValHisHisProProThrThrAsnAspGlnGlnSerLeuTyrGln  
 631 AATGCTGATGCATATGTTTCAGTTGGGTCATCAAAATACAACCGAAGGTTACACCAGAAATA  
 211 ▶ AsnAlaAspAlaTyrValSerValGlySerSerLysTyrAsnArgArgPheThrProGluIle  
 694 GCAGCTAGACCTAAAGTCAAAGGACAAGCAGGCAGAATGAATTATTATTGGACATTGTTAGAT  
 232 ▶ AlaAlaArgProLysValLysGlyGlnAlaGlyArgMetAsnTyrTyrTrpThrLeuLeuAsp  
 757 CAAGGAGACACCATAACGTTTGAAGCCACTGGGAACTTAATAGCACCATGGTACGCCCTTCGCA  
 253 ▶ GlnGlyAspThrIleThrPheGluAlaThrGlyAsnLeuIleAlaProTrpTyrAlaPheAla  
 820 TTGAATAAGGGCTCTGGTTCTGGAATTATAACGTCGGATACTCCGGTTCACAATTGTGATACA  
 274 ▶ LeuAsnLysGlySerGlySerGlyIleIleThrSerAspThrProValHisAsnCysAspThr  
 883 AAGTGCCAAACCCCTCATGGGGCCTTGAAACAGTAGTCTTCCTTTTCAGAACGTACATCCCATC  
 295 ▶ LysCysGlnThrProHisGlyAlaLeuAsnSerSerLeuProPheGlnAsnValHisProIle  
 946 ACTATTGGAGAATGCCCCAAATATGTTAAAAGCACCAAACTGAGAATGGCAACAGGACTAAGG  
 316 ▶ ThrIleGlyGluCysProLysTyrValLysSerThrLysLeuArgMetAlaThrGlyLeuArg  
 1009 AACGTCCCCTCTATTCAATCCAGAGGACTTTTCGGAGCAATTGCTGGAATTCATTGAAGGAGGA  
 337 ▶ AsnValProSerIleGlnSerArgGlyLeuPheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluGlyGly

Figure N° 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



9/31

1072 TGGACAGGAATGATAGATGGGTGGTATGGGTATCACCATCAGAATGAGCAGGGATCTGGTTAC  
358 TrpThrGlyMetIleAspGlyTrpTyrGlyTyrHisHisGlnAsnGluGlnGlySerGlyTyr

1135 GCAGCTGATCAGAAAAGCACACAAATTGCAATTGACGGGATCAGCAACAAAGTGAAGTCAGTA  
379 AlaAlaAspGlnLysSerThrGlnIleAlaIleAspGlyIleSerAsnLysValAsnSerVal

1198 ATTGAGAAAAATGAACACTCAATTCACTGCAGTGGGCAAGGAATTCAATGATCTAGAAAAAAGG  
400 IleGluLysMetAsnThrGlnPheThrAlaValGlyLysGluPheAsnAspLeuGluLysArg

1261 ATTGAGAATTTGAATAAGAACTCGATGATGGGTTTTTGGATGTTTGGACATATAATGCTGAG  
421 IleGluAsnLeuAsnLysLysValAspAspGlyPheLeuAspValTrpThrTyrAsnAlaGlu

1324 TTGCTCGTTTTGCTCGAGAACGAAAGGACTCTAGATTTCCATGACTTTAACGTAAGAAATTTA  
442 LeuLeuValLeuLeuGluAsnGluArgThrLeuAspPheHisAspPheAsnValArgAsnLeu

1387 TATGAAAAGGTCAAGTCACAATTGAGAAACAATGCCAAAGAAATCGGGAATGGTTGTTTTGAG  
463 TyrGluLysValLysSerGlnLeuArgAsnAsnAlaLysGluIleGlyAsnGlyCysPheGlu

1450 TTCTATCACAAATGTGATGACGAATGCATGAAGAGCGTAAAGAATGGCACATATAACTACCCC  
484 PheTyrHisLysCysAspAspGluCysMetLysSerValLysAsnGlyThrTyrAsnTyrPro

1513 AAATATTGAGAAGAATCCAAATTGAATAGAGAGGAAATAGACGGTGTGAAACTAGAATCAATG  
505 LysTyrSerGluGluSerLysLeuAsnArgGluGluIleAspGlyValLysLeuGluSerMet

1576 GGAGTTTACCAGATTTTGGCGATCTACTCCACAGTCGCCAGTTCCCTGGTCTTGTTAGTCTCC  
526 GlyValTyrGlnIleLeuAlaIleTyrSerThrValAlaSerSerLeuValLeuLeuValSer

1639 CTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCTAATGGGTCATTGCAATGCAGAATATGCATTTAA  
547 LeuGlyAlaIleSerPheTrpMetCysSerAsnGlySerLeuGlnCysArgIleCysIle...

Figure N° 6 (suite et fin)

10/31

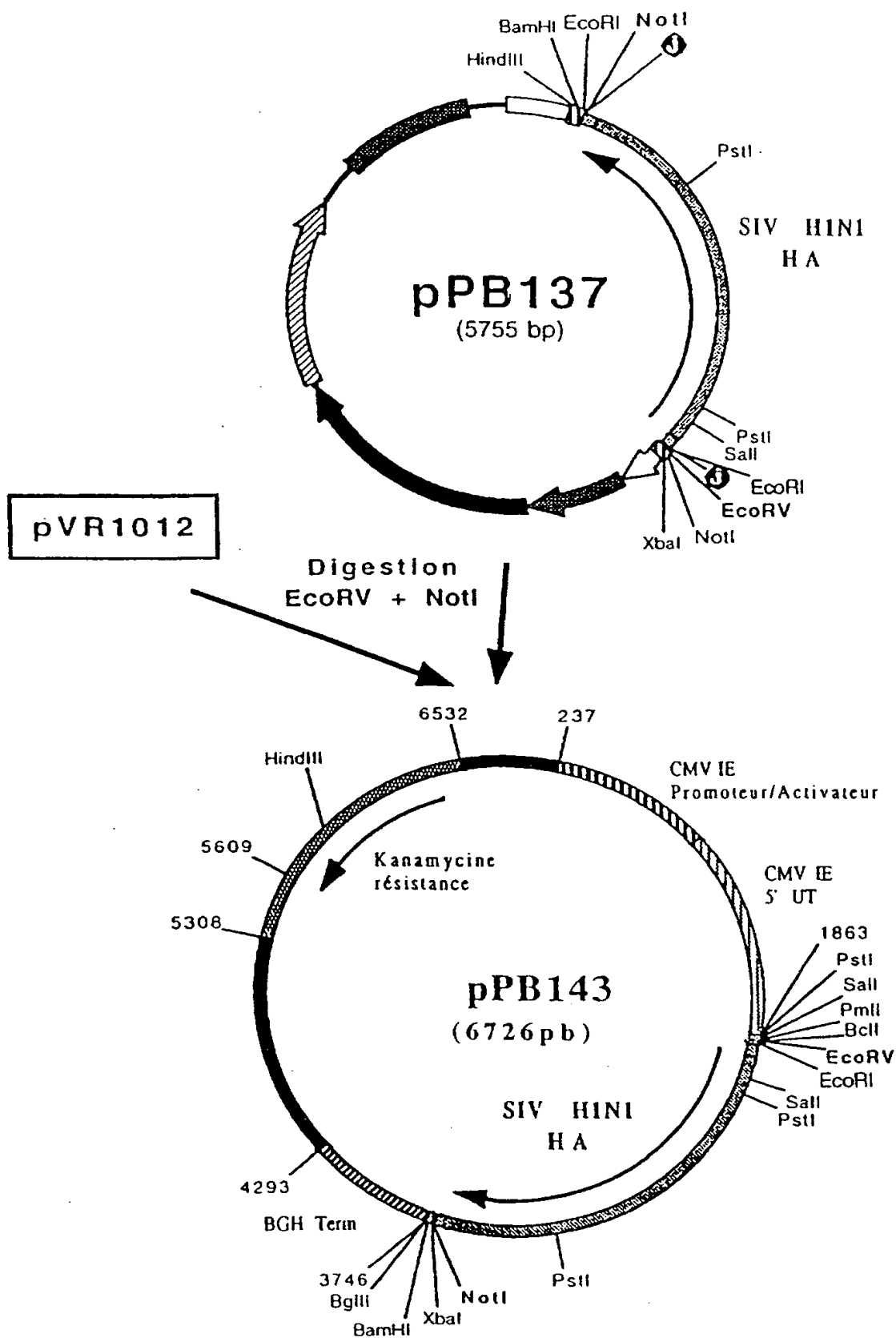


Figure N° 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/31

1 ATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGCGAGAACGCCAGAAT  
 1 ▶ MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgGlnAsn  
 64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGGAATGGTTGGTGGAAATTGGAAGATTCTACATACAG  
 22 ▶ AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln  
 127 ATGTGCACTGAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA  
 43 ▶ MetCysThrGluLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle  
 190 GAGAGAATGGTTCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAACATCCCAGT  
 64 ▶ GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer  
 253 GCGGGGAAGGACCCAAAGAAAACTGGAGGTCCAATCTACAGAAAGAGAGACGGAAAATGGATG  
 85 ▶ AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet  
 316 AGAGAGCTGATTCTATATGACAAAGAGGAGATCAGGAGGATTTGGCGTCAAGCAAACAATGGT  
 106 ▶ ArgGluLeuIleLeuTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly  
 379 GAAGATGCTACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACA  
 127 ▶ GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr  
 442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACTGGGATGGACCCCAGAATGTGCTCTCTGATGCAA  
 148 ▶ TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln  
 505 GGATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGTGCGGCAGTAAAGGGAGTTGGGACCATG  
 169 ▶ GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet  
 568 GTAATGGAAGTGAATTCGGATGATAAAAGCGGGGATCAATGATCGGAACCTCTGGAGAGGCGAA  
 190 ▶ ValMetGluLeuIleArgMetIleLysAlaGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu  
 631 AATGGACGAAGAACAAGAATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTTTCAG  
 211 ▶ AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln  
 694 ACAGCAGCGCAACAAGCAATGATGGACCAGGTGCGAGAAATGACAAATCCTGGGAATGCTGAG  
 232 ▶ ThrAlaAlaGlnGlnAlaMetMetAspGlnValArgGluMetThrAsnProGlyAsnAlaGlu  
 757 ACTGAAGACCTTATCTTTCTGGCACGATCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA  
 253 ▶ ThrGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys  
 820 TCCTGCCTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGTGTGGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA  
 274 ▶ SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu  
 883 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGCTCTGCTCCAAAACAGCCAGGTGTTTCAGCCTC  
 295 ▶ GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu  
 946 ATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAGAGTCAGCTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA  
 316 ▶ IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla  
 1009 GCATTTGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAA  
 337 ▶ AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrArgValValProArgGlyGln

Figure N° 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

12/31

1072 CTGTCCACCAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAAAACATGGAAACAATGGAGTCCAGTACT  
358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetGluSerSerThr  
1135 CTTGAACTGAGAAGCAAATACTGGGCTATAAGAACCAGGAGCGGAGGAAACACCAACCAACAG  
379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln  
1198 AGAGCATCTGCAGGGCAAATCAGTGTACAACCTTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTC  
400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnLeuThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe  
1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGG  
421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg  
1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCTCTCCAGGGGCGGGGA  
442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly  
1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAAT  
463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspMetSerAsn  
1450 GAGGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAA  
484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAspAsn...

Figure N° 8 (suite et fin)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

13/31

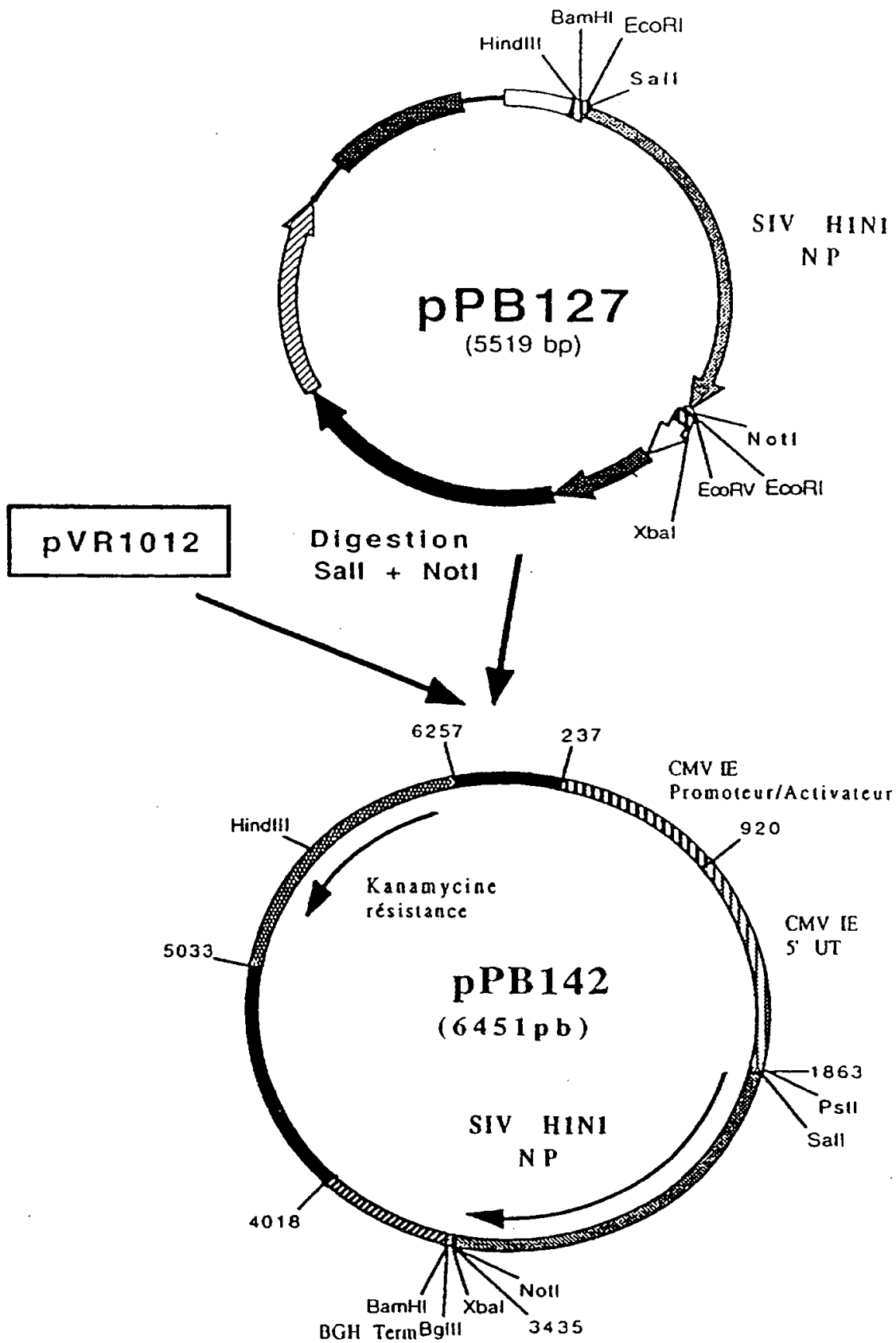


Figure N° 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

14/31

1 ATGAAGACTGTCATTGCCTTGAGCTACATTTTCTGTCTGGTTCTTGGCCAAGACCTTCCAGAA  
 1 MetLysThrValIleAlaLeuSerTyrIlePheCysLeuValLeuGlyGlnAspLeuProGlu  
 64 AATGGCAGCAGCACAGCAAAGCCTGGTCTGGGACATCATGCGGTGCCAAACGGAACGTTAGTG  
 22 AsnGlySerSerThrAlaLysProGlyLeuGlyHisHisAlaValProAsnGlyThrLeuVal  
 127 AAAACAATCAGCAATGATCAGATCGAAGTGACTAATGCTACTGAGCTGGTCCAGAGTTTCTCA  
 43 LysThrIleThrAsnAspGlnIleGluValThrAsnAlaThrGluLeuValGlnSerPheSer  
 190 ATGGGTAAATATGCAACAATCCTCATCGAGTTCTTGATGGAGCAAACGTGACTGATAGAT  
 64 MetGlyLysIleCysAsnAsnProHisArgValLeuAspGlyAlaAsnCysThrLeuIleAsp  
 253 GCTCTATTGGGGGACCCCTCATTGTGATGGCTTTCAAAATGAGAAATGGGACCTTTTCGTTGAA  
 85 AlaLeuLeuGlyAspProHisCysAspGlyPheGlnAsnGluLysTrpAspLeuPheValGlu  
 316 CGCAGCAAATGCTTCAGCAACTGTTACCCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCTCCCTTAGGTCA  
 106 ArgSerLysCysPheSerAsnCysTyrProTyrAspValProAspTyrAlaSerLeuArgSer  
 379 CTAATTGCCTCTTCGGGCACTTTGGAGTTTATCAATGAAGGTTTCAATTGGACTGGGGTCACT  
 127 LeuIleAlaSerSerGlyThrLeuGluPheIleAsnGluGlyPheAsnTrpThrGlyValThr  
 442 CAGAACGGAGGAAGCAATGCTTGCAAGAGGGGGCCTGATAGCGGTTTCTTCAGTAGGCTGAAC  
 148 GlnAsnGlyGlySerAsnAlaCysLysArgGlyProAspSerGlyPhePheSerArgLeuAsn  
 505 TGGTTGTACAAATCAGGAAACACATACCCGATGCTGAACGTGACTATGCCAAACAGTGATAAT  
 169 TrpLeuTyrLysSerGlyAsnThrTyrProMetLeuAsnValThrMetProAsnSerAspAsn  
 568 TTTGACAAATTATACATTTGGGGGGTTTACCATCCGAGCACAGACAGGGAACAAACCAACCTA  
 190 PheAspLysLeuTyrIleTrpGlyValHisHisProSerThrAspArgGluGlnThrAsnLeu  
 631 TATGTTCAAGTATCAGGGAAGCAACGGTTTTCACCAAGAGAAGCCAGCAGACCATAATCCCG  
 211 TyrValGlnValSerGlyLysAlaThrValPheThrLysArgSerGlnGlnThrIleIlePro  
 694 AACAGTCGGTCTAGACCCTGGGTAAGGGTCTGTCTAGTAGAATAAGCATCCATTGGACAATA  
 232 AsnSerArgSerArgProTrpValArgGlyLeuSerSerArgIleSerIleHisTrpThrIle  
 757 GTTAAACCGGGGACATTCTGATAATTAATAGTAATGGGAACCTAATTGCTCCTCGGGGTAC  
 253 ValLysProGlyAspIleLeuIleIleAsnSerAsnGlyAsnLeuIleAlaProArgGlyTyr  
 820 TTCAAATGCACAATGGGAGAAGCTCAATAATGAGGTCAGATGCACCTATTGGCACCTGCAGT  
 274 PheLysMetHisAsnGlyArgSerSerIleMetArgSerAspAlaProIleGlyThrCysSer  
 883 TCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATCCCAAATGACAAACCCCTTTCAAACGTAACAAG  
 295 SerGluCysIleThrProAsnGlySerIleProAsnAspLysProPheGlnAsnValAsnLys  
 946 ATCACATATGGGGCATGTCCTAAGTATGTTAAACAAACACTCTGAAGTTGGCAACAGGGATG  
 316 IleThrTyrGlyAlaCysProLysTyrValLysGlnAsnThrLeuLysLeuAlaThrGlyMet  
 1009 CGGAATATACCGGAAAAACAACTAGAGGCATATTGCGCGCAATAGCAGTTTTCATAGAGAAT  
 337 ArgAsnIleProGluLysGlnThrArgGlyIlePheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluAsn

Figure N° 10

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

15/31

1072 GGTTGGGAAGGAATGGTAGACGGCTGGTACGGTTTCAGACATCAAAATTCTGAGGGCACAGGA  
358 ▶ GlyTrpGluGlyMetValAspGlyTrpTyrGlyPheArgHisGlnAsnSerGluGlyThrGly  
1135 CAAGCAGCAGACCTTAAAAGCACCCCAAGCAGCCATCGACCAAATCAACGGGAACTGAATAGA  
379 ▶ GlnAlaAlaAspLeuLysSerThrGlnAlaAlaIleAspGlnIleAsnGlyLysLeuAsnArg  
1198 CTAATCGAGAAGACGAACGGGAAATTCCATCAAATCGAAAAGGAATTCTCAATAGTAGAAGGG  
400 ▶ LeuIleGluLysThrAsnGlyLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerIleValGluGly  
1261 AGAATTCAGGACCTCGAGAAATACGTTGAAGACACTAAAATAGATCTCTGGTCTTACAATGCG  
421 ▶ ArgIleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAla  
1324 GAACTTCTTGTCGCTCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTGACTGACTCGGAAATGAGCAAA  
442 ▶ GluLeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspSerGluMetSerLys  
1387 CTGTTTGAAAAACAAGGAGGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGACATGGGAAACCGTTGCCCTT  
463 ▶ LeuPheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyAsnGlyCysLeu  
1450 CAAATATACCACAAATGTGACAATGCTTGATAGAGTCAATCAGAAATGGGACTTATGACCAT  
484 ▶ GlnIleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGluSerIleArgAsnGlyThrTyrAspHis  
1513 AATGAATACAGAGACGAAGCATTAAACAACCGATTTTCAGATCAAAGGTGTTGAGCTGAAGTCG  
505 ▶ AsnGluTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSer  
1576 GGATACAAAGACTGGATCCTGTGGATTTCTCTGCCATATCATGCTTTTTGCTTTGTGTTGTT  
526 ▶ GlyTyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerSerAlaIleSerCysPheLeuLeuCysValVal  
1639 TTGCTAGGATTTATCATGTGGGCCTGCCAGAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATCTGA  
547 ▶ LeuLeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

Figure N° 10 ( suite et fin )

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

16/31

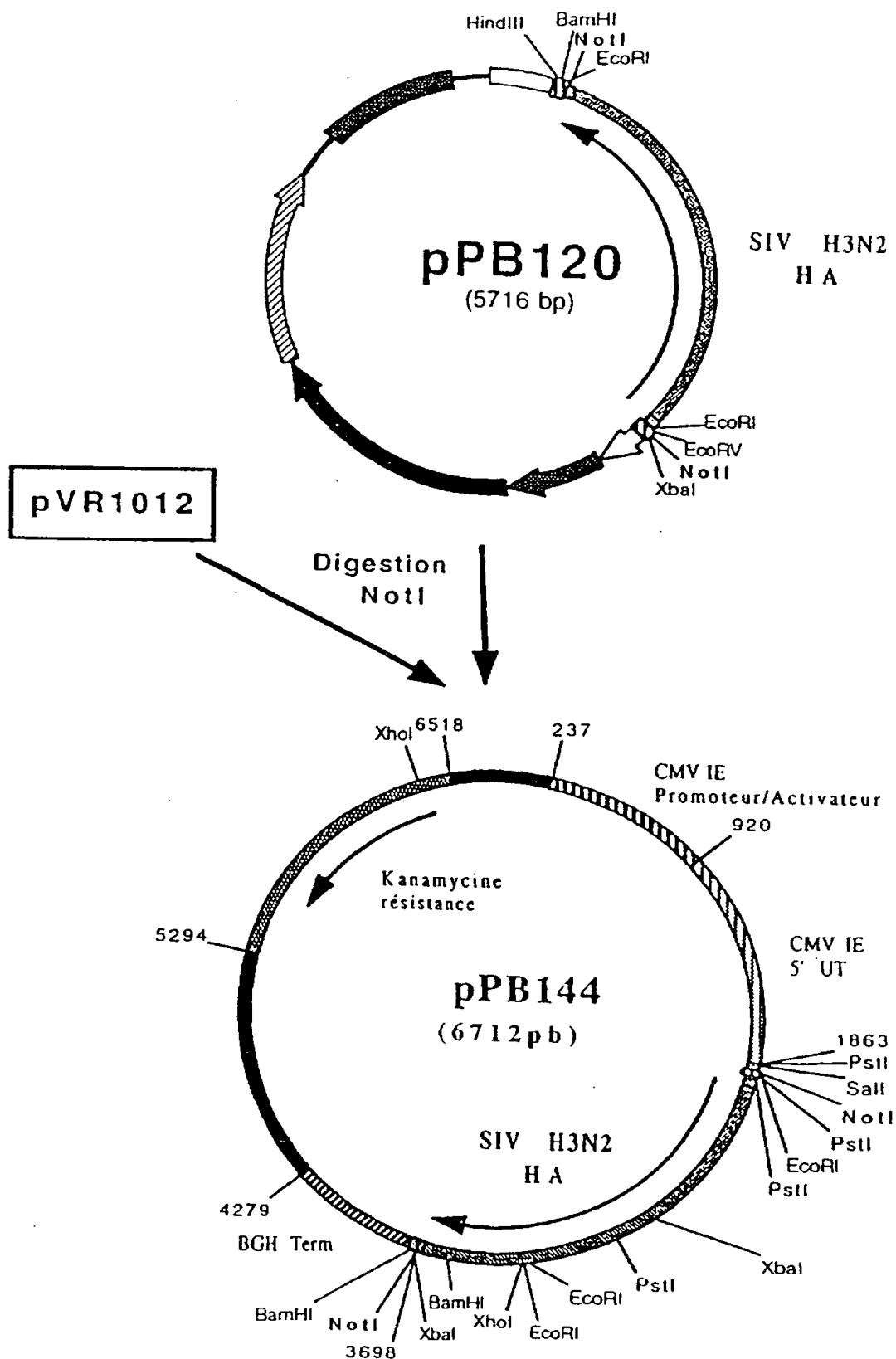


Figure N° 11

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



17/31

1 ATGGCGTCTCAAGGCACTAAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGGAGAACGCCGGAAT  
 1 ▶ MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgArgAsn  
 64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGGAATGGTTGGTGGAAATTGGAAGATTCTACATACAG  
 22 ▶ AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln  
 127 ATGTGCACTAAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA  
 43 ▶ MetCysThrLysLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle  
 190 GAGAGAATGGTTCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAACATCCCAGT  
 64 ▶ GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer  
 253 GCGGGGAAGGACCCAAAGAAAACCTGGAGGTCCAATATACAGAAAGAGAGACGGAAAATGGATG  
 85 ▶ AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet  
 316 AGAGAGCTGATTATGTATGACAAAGAGGAGATCAGGAGGATTTGGCGTCAAGCAAACAATGGT  
 106 ▶ ArgGluLeuIleMetTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly  
 379 GAAGATGCTACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACA  
 127 ▶ GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr  
 442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGGTACTGGGATGGACCCAGAAATGTGCTCTCTGATGCAA  
 148 ▶ TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln  
 505 GGATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGCTGCAGCAGTAAAGGGAGTTGGGACGATG  
 169 ▶ GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet  
 568 GTAATGGAAGTATTCCGGATGATAAAGCGGGGGATCAATGATCGGAACCTTCTGGAGAGGCGAA  
 190 ▶ ValMetGluLeuIleArgMetIleLysArgGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu  
 631 AATGGACGAAGAACAAGAATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTTTCAG  
 211 ▶ AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln  
 694 ACAGCAGCGCAACGAGCAACGATGGACCAGGTGCGAGAAAGCAGAAATCCTGGGAATGCTGAG  
 232 ▶ ThrAlaAlaGlnArgAlaThrMetAspGlnValArgGluSerArgAsnProGlyAsnAlaGlu  
 757 ATTGAAGACCTTATCTTTCTAGCACGATCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA  
 253 ▶ IleGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys  
 820 TCCTGTCTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGTGTGCGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA  
 274 ▶ SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu  
 883 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGCTCTGCTCCAGAACAGCCAGGTGTTTCAGCCTC  
 295 ▶ GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu  
 946 ATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAGAGTCAGTTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA  
 316 ▶ IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla  
 1009 GCATTTGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGGACAAAAGTGGTCCCAAGAGGACAA  
 337 ▶ AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrLysValValProArgGlyGln

Figure N° 12

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

18/31

1072 CTGTCCACTAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAAAACATGGAAACAATGGACTCCATTACT  
358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetAspSerIleThr  
1135 CTTGAACTGAGAAGCAAATACTGGGCTATAAGAACCAGGAGCGGAGGAAACCAACCAACAG  
379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln  
1198 AGGGCATCTGCAGGGCAAATCAGTGTACAACCTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTC  
400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnProThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe  
1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGCATGAGG  
421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg  
1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCCTTCCAGGGCGGGGA  
442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly  
1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAAGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACGTGAGTAAT  
463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspValSerAsn  
1450 GAGGCATCTTATTTCTTCGGAGACAATCCAGAGGAGTATAACAATTAA  
484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAsnAsn...

Figure N° 12 (suite et fin)

19/31

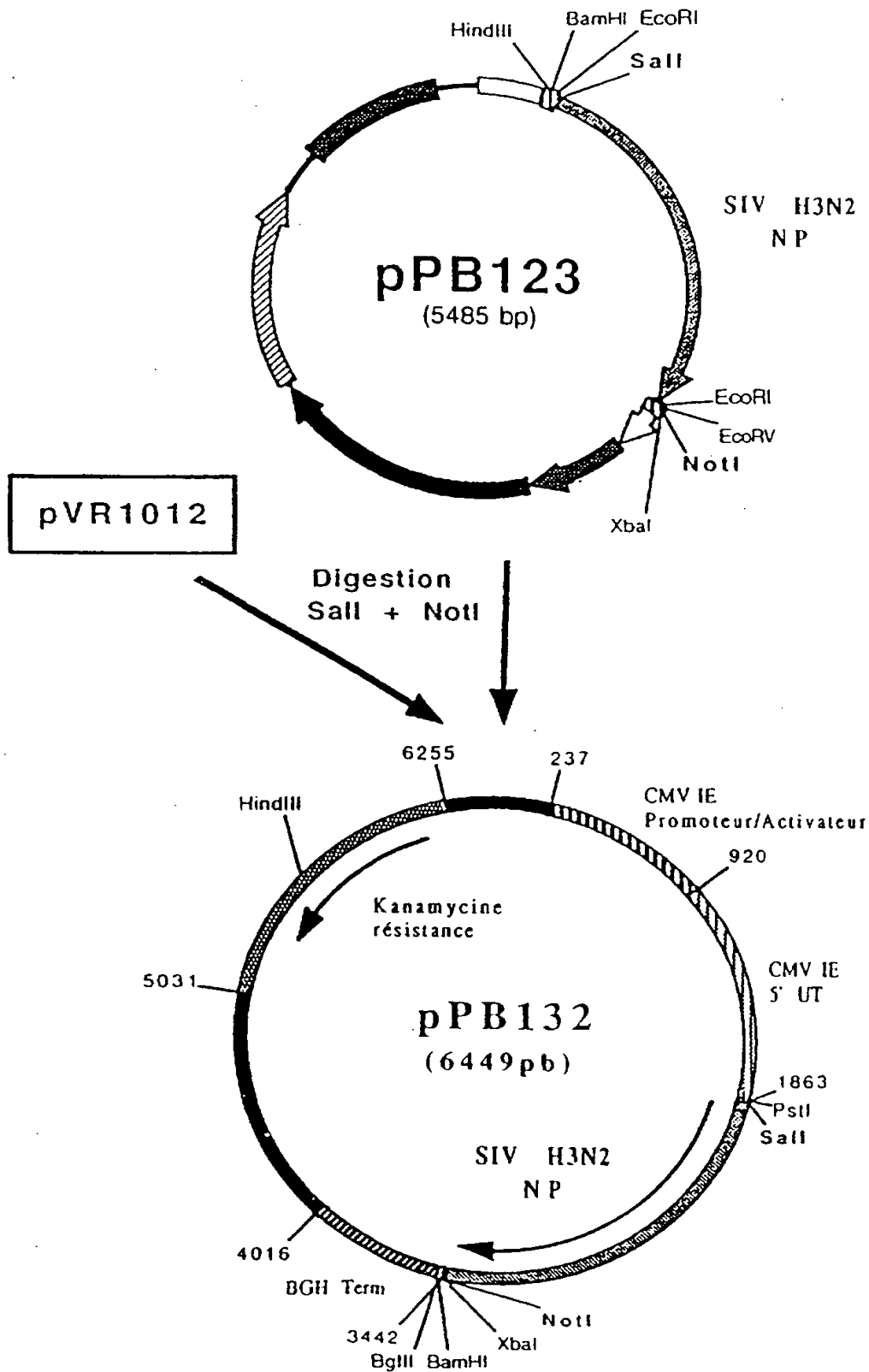


Figure N° 13

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

20/31

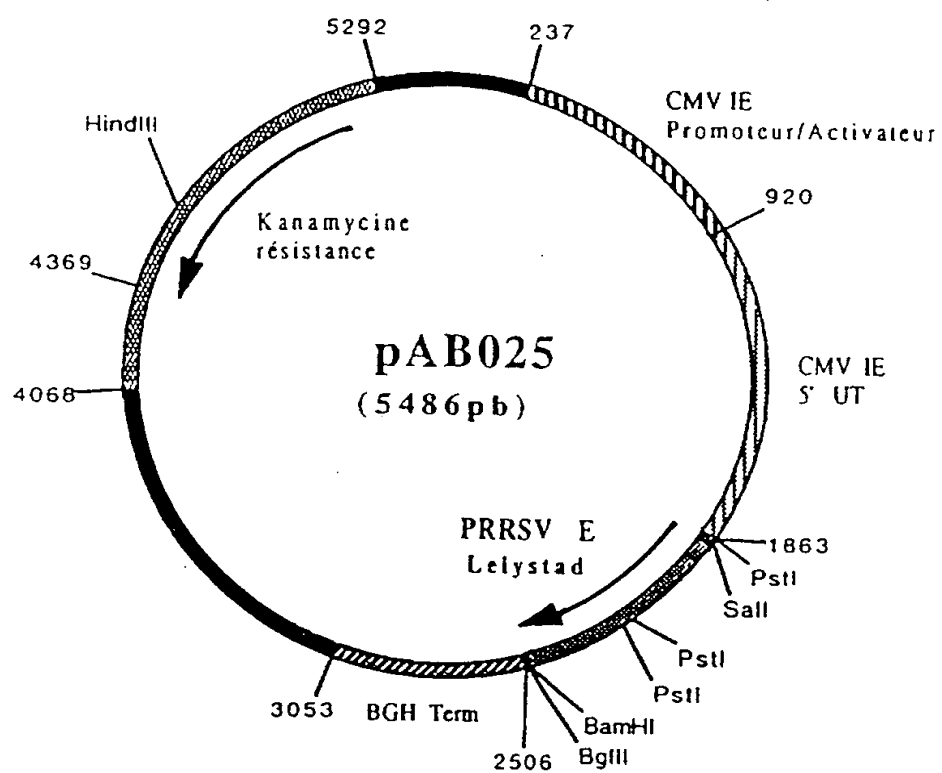


Figure N° 14

21/31

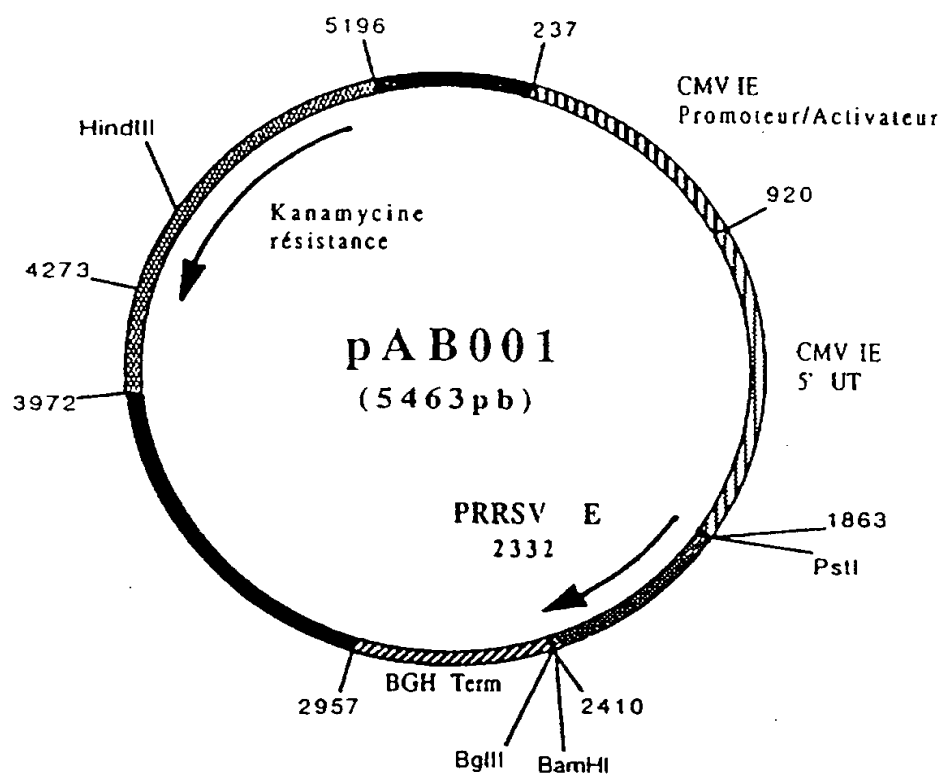


Figure N° 15

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

22/31

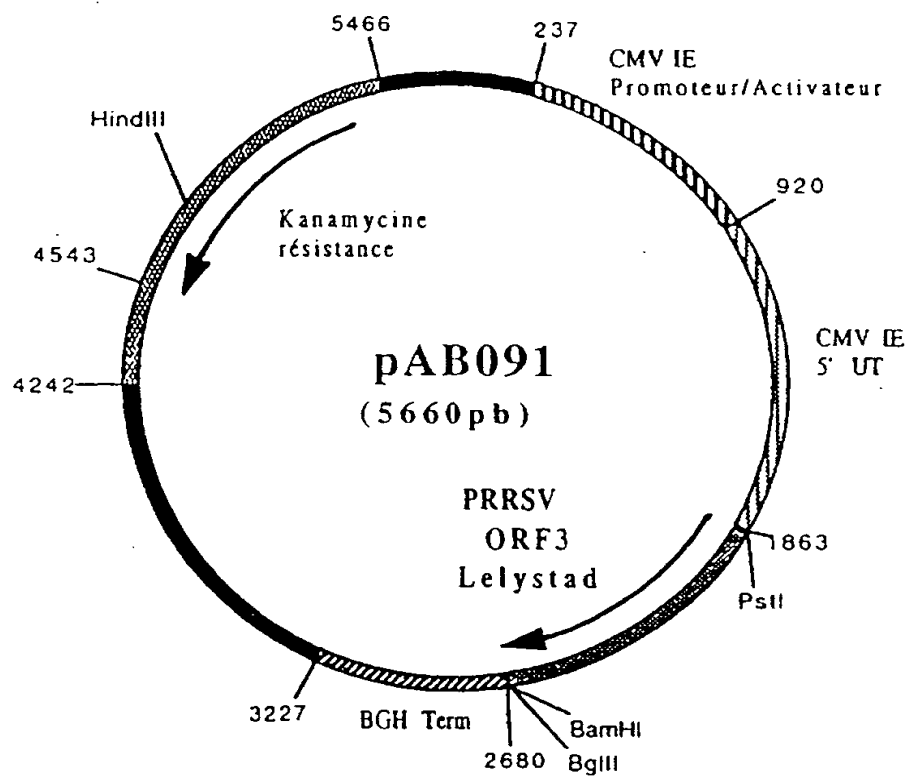


Figure N° 16

23/31

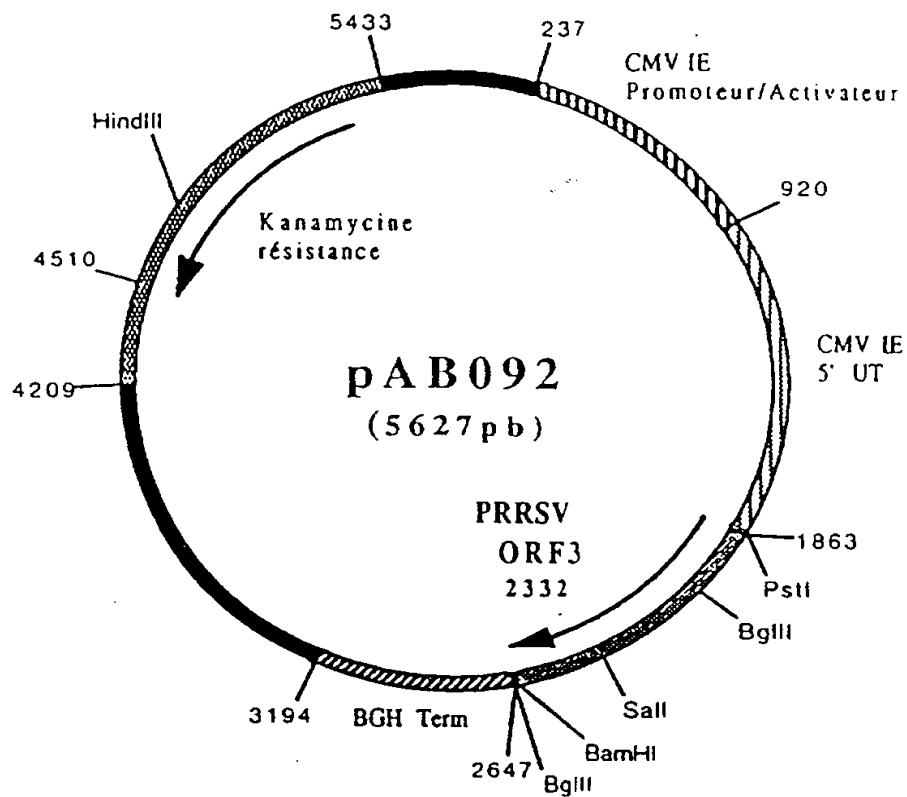


Figure N° 17

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

24/31

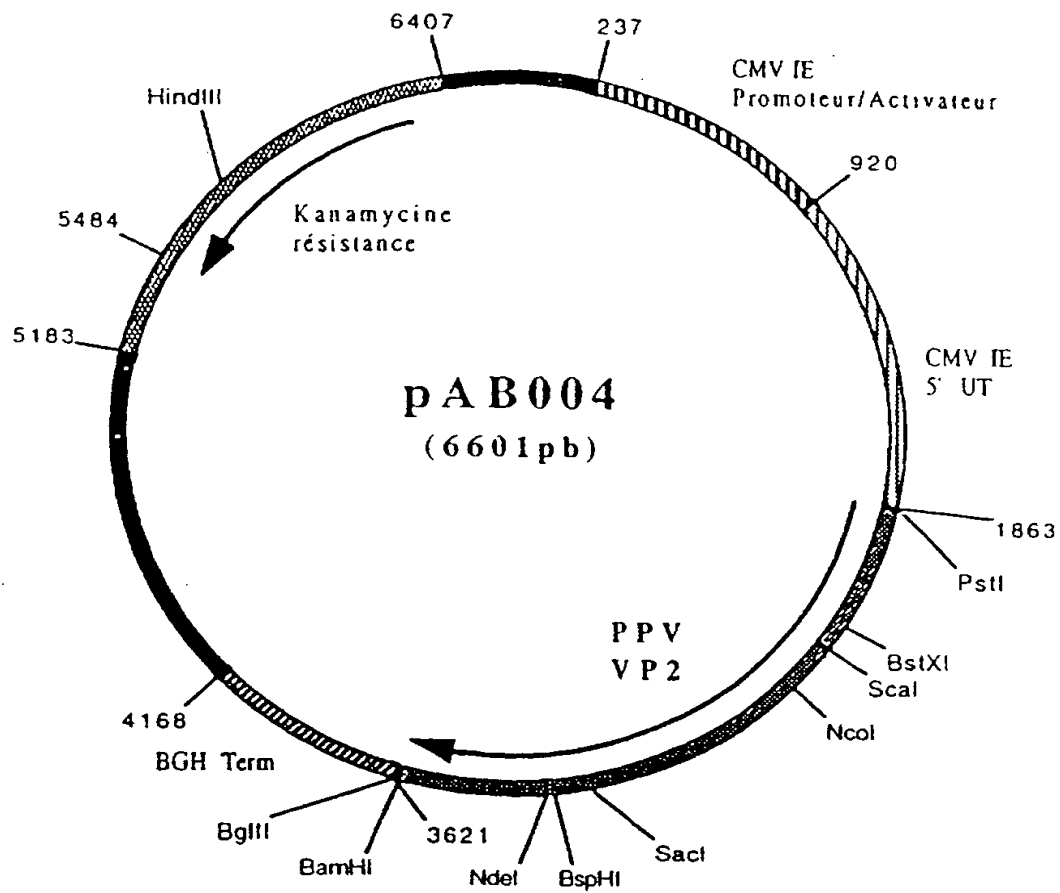


Figure N° 18

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



25/31

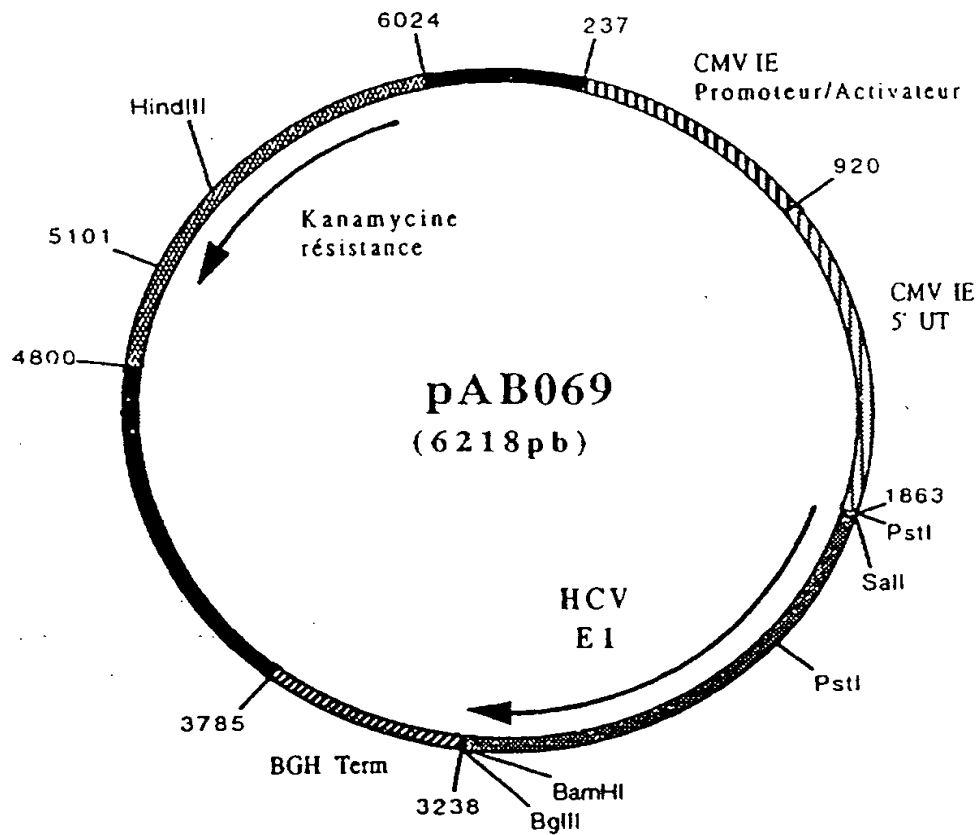


Figure N° 19

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

26/31

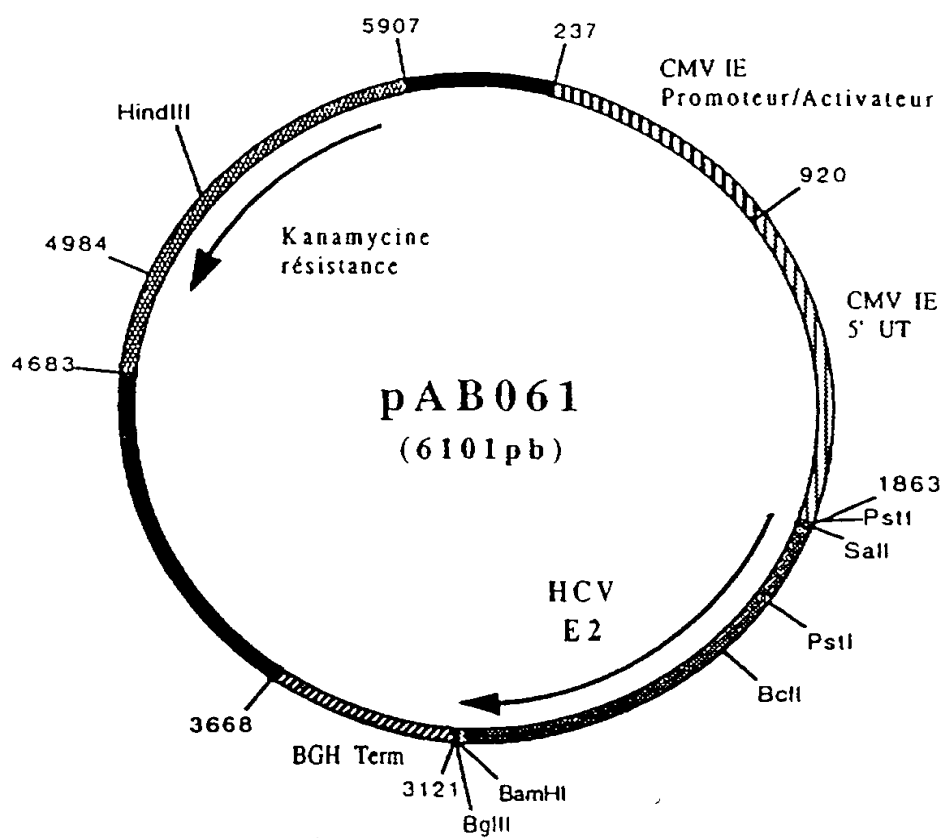


Figure N° 20

27/31

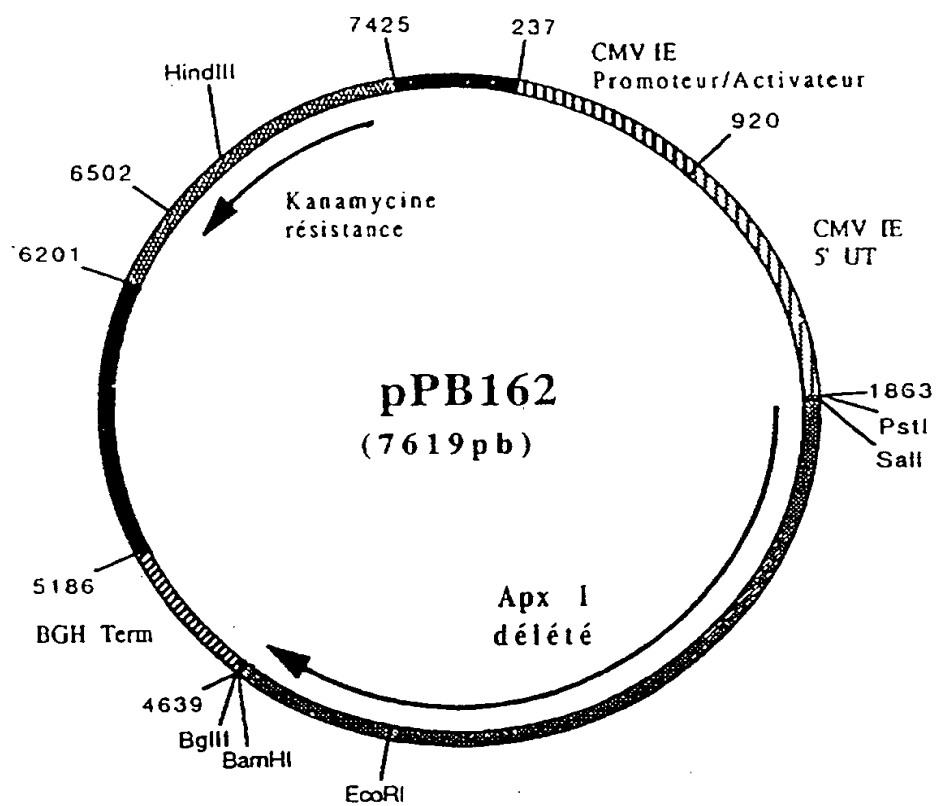


Figure N° 21

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

28/31

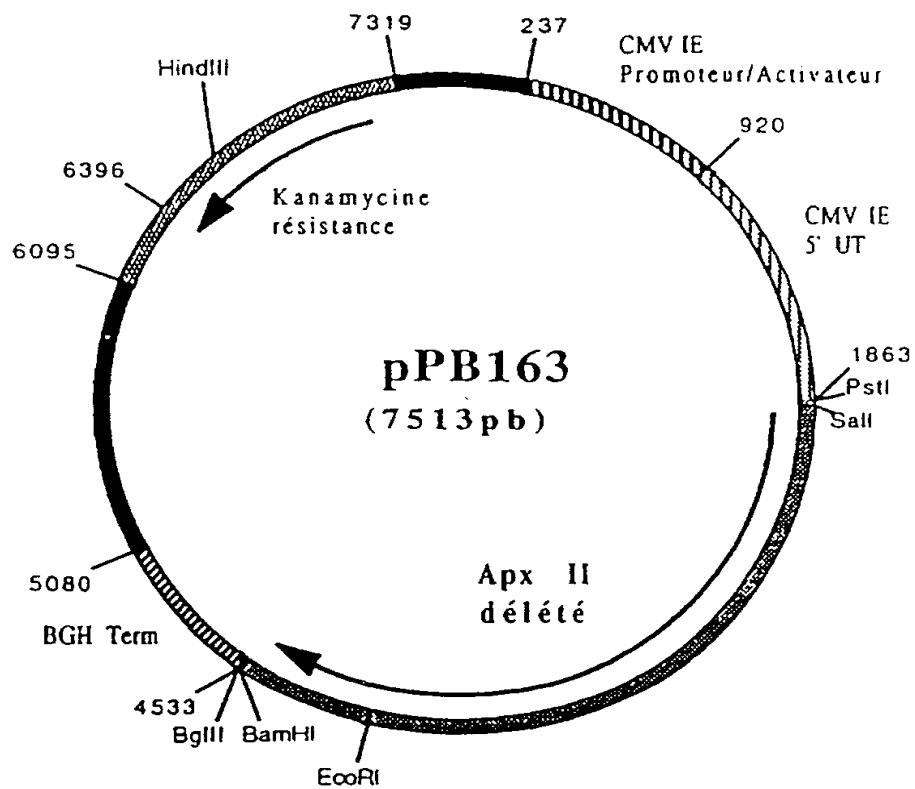


Figure N° 22

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

29/31

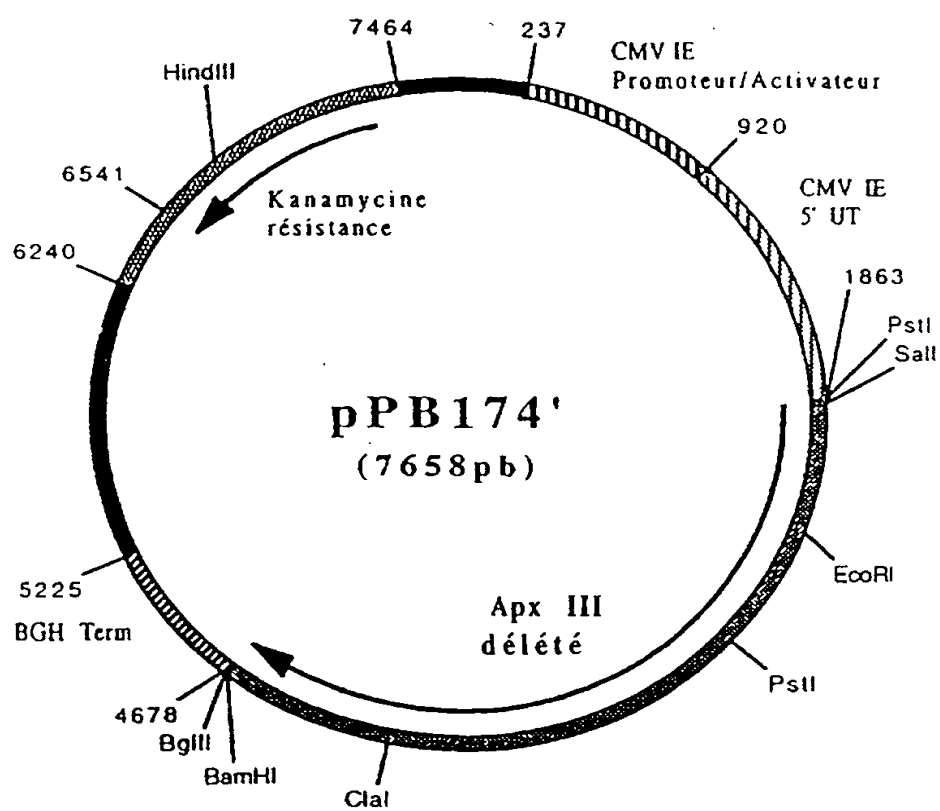


Figure N° 23

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

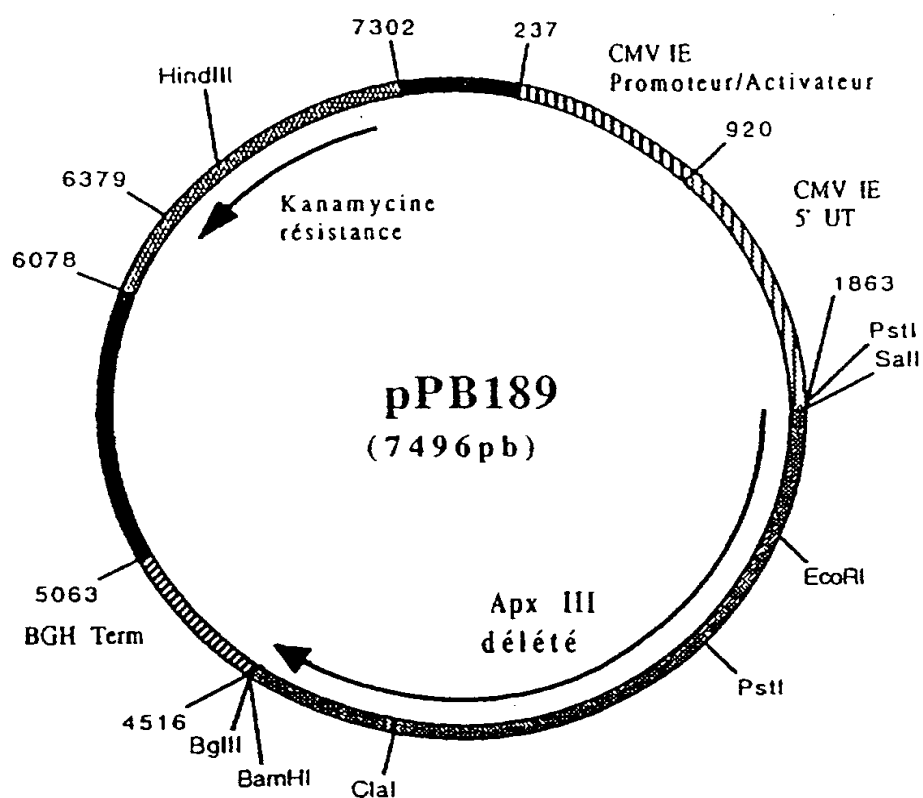


Figure N° 24

31/31

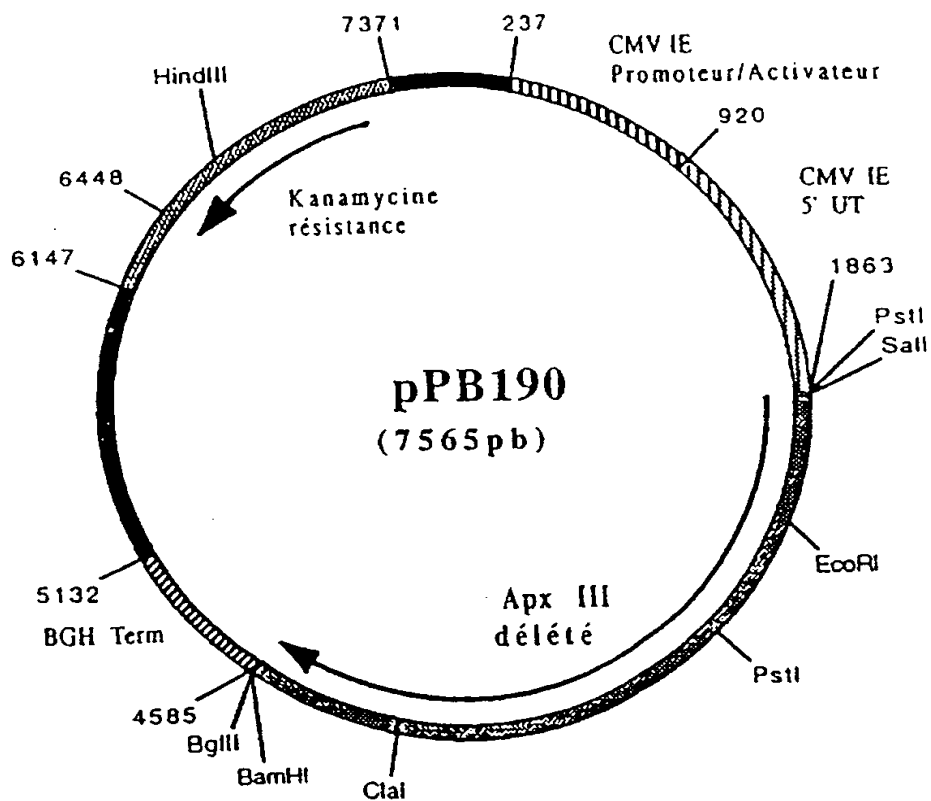


Figure N° 25

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01313

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/38 C12N15/44 C12N15/40 C12N15/35 C12N15/31  
A61K39/295

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 06619 A (PAUL PREM S ; MENG XIANG JIN (US); HALBUR PATRICK (US); MOROZOV IGO) 7 March 1996 see claims 1,14	1-14
A	WO 95 20660 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL ; ST JUDE CHILDREN S RESEARCH HO (US)) 3 August 1995 cited in the application see page 1, line 27 - page 3, line 13 see page 6, line 16 - page 13, line 33	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 1997

Date of mailing of the international search report

09/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01313.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9606619 A	07-03-96	CA 2198461 A EP 0776209 A	07-03-96 04-06-97
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A EP 0740704 A JP 9508622 T US 5620896 A	03-08-95 06-11-96 02-09-97 15-04-97

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 97/01313

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/38 C12N15/44 C12N15/40 C12N15/35 C12N15/31  
A61K39/295

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 06619 A (PAUL PREM S ; MENG XIANG JIN (US); HALBUR PATRICK (US); MOROZOV IGO) 7 mars 1996 voir revendications 1,14 -----	1-14
A	WO 95 20660 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL ; ST JUDE CHILDREN S RESEARCH HO (US)) 3 août 1995 cité dans la demande voir page 1, ligne 27 - page 3, ligne 13 voir page 6, ligne 16 - page 13, ligne 33 -----	1-14

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 décembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/12/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema. Internationale No

PCT/FR 97/01313

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9606619 A	07-03-96	CA 2198461 A	07-03-96
		EP 0776209 A	04-06-97
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		JP 9508622 T	02-09-97
		US 5620896 A	15-04-97

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**